

**Über die Aussagesicherheit der Substanzidentifizierung mittels HPLC-DAD in
der Systematischen Toxikologischen Analyse unter Verwendung einer
selbsterstellten UV-Spektrenbibliothek mit 2.682 Einträgen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Matthias Herzler

geboren am 23. Dezember 1966 in Münster/Westfalen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Michael W. Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Fritz Pragst
 2. Prof. Dr. rer. nat. Michael W. Linscheid
 3. PD Dr. rer. nat. habil. Ulrich Demme

Tag der mündlichen Prüfung: 17. März 2003

Inhaltsverzeichnis

1	<i>EINLEITUNG</i>	1
2	<i>THEORETISCHE GRUNDLAGEN</i>	4
2.1	Die Systematische Toxikologische Analyse	4
2.1.1	Zum Begriff der STA	4
2.1.2	Toxikologische Relevanz	5
2.1.3	Gesamtstrategie für die STA	7
2.1.4	Literatur zur Probenaufarbeitung für die STA	8
2.1.5	Literatur zu analytischen Messverfahren in der STA	12
2.1.6	Literatur zu Spektrenbibliotheken	14
2.1.7	HPLC	15
2.1.8	UV-Spektroskopie an organischen Molekülen	15
2.1.9	Der Diodenarraydetektor	18
2.2	Analytisch-chemische Identifizierung mittels HPLC-DAD	19
2.2.1	Ergebnisraum, Dimensionalität, Identifizierung	19
2.2.2	HPLC: Substanzidentifizierung über die Retentionszeit	20
2.2.3	DAD: Substanzidentifizierung über das UV-Spektrum	23
2.2.4	Vorgehen in der Praxis: Kombination von RRT und Spektrum	24
2.3	Validierung	26
2.3.1	Validierung in der forensischen Toxikologie	26
2.3.2	Genauigkeit: Richtigkeit und Präzision	27
2.3.3	Selektivität	28
2.3.4	Spezifität	29
2.3.5	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	30
2.4	Vergleich der Leistungsfähigkeit von Analysenverfahren	30
2.4.1	Informationstheorie	30
2.4.2	Statistische Selektivitätsparameter	34
2.5	Multivariate Methoden	35
2.5.1	Der multivariate Raum	35
2.5.2	Prinzipien und Ziele multivariater chemometrischer Verfahren	37
2.5.3	Hauptkomponentenanalyse	37
2.5.4	Gruppierung: Clusteranalyse	39
2.5.5	Klassifizierung: Diskriminanzanalyse	40
2.5.6	Andere Verfahren	44
2.5.7	Anwendungsbeispiele aus der Literatur	45

3	<i>MATERIAL UND METHODEN</i>	47
3.1	Das HPLC-DAD-Messverfahren	47
3.1.1	Verwendete Chemikalien und Lösungen	47
3.1.2	Geräte für die Probenaufarbeitung	47
3.1.3	Vorschriften für die Probenvorbereitung	48
3.1.4	Geräte für die HPLC-Messungen	48
3.1.5	Probenvorbereitung für die STA	49
3.1.6	Messbedingungen für die STA	49
3.2	Messung der Spektrenbibliothek	50
3.2.1	Auswahl der Substanzen	50
3.2.2	Datenregistrierung und Kennzeichnung der Wirkstoffe	50
3.2.3	Qualitätskontrolle der Geräte	51
3.2.4	Durchführung und Auswertung der Messungen für die Spektrenbibliothek	51
3.2.5	Datenbanken	52
3.2.6	Qualitätskontrolle der Messergebnisse	52
3.3	Wiederfindung, Präzision und Richtigkeit	53
3.3.1	Probenvorbereitung: Wiederfindung	53
3.3.2	Probenvorbereitung: Präzision	53
3.3.3	Präzision und Richtigkeit der UV - Spektren	53
3.3.4	Präzision und Richtigkeit bei der Retentionszeitmessung	54
3.3.5	Präzision und Richtigkeit der Peakflächen	55
3.4	Prüfung neuer Trennsäulen	55
3.5	Einfluss von Störungen des Spektrums auf den Similarity Index	56
3.6	Berechnung und Auswertung der Ähnlichkeits- bzw. Identifikationsmatrizen	57
3.7	Spektroskopische Variabilität	58
3.8	Durchführung der Clusteranalysen	58
3.9	Durchführung der Diskriminanzanalysen	58
4	<i>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</i>	59
4.1	Spektrenbibliothek und Datenbanken	59
4.1.1	Auswahl der Substanzen / Toxikologische Relevanz	59
4.1.2	Die Spektrenbibliothek	62
4.1.3	Datenbanken	64
4.2	Anforderungen an die Validierung von Messverfahren für die STA	66
4.2.1	Einführung	66
4.2.2	Anforderungen an die Substanzidentifizierung im Rahmen der STA	66

4.2.3	Anforderungen an die Quantifizierung im Rahmen der STA.....	67
4.3	Matrixeinflüsse.....	67
4.4	Genauigkeit bei der Identifizierung.....	68
4.4.1	Genauigkeit der UV-Spektren	68
4.4.2	Genauigkeit der absoluten und relativen Retentionszeiten.....	70
4.4.3	Fehler der RRT	72
4.5	Selektivität.....	73
4.5.1	Verteilung der RRT-Werte auf den Messbereich	74
4.5.2	Prüfung neuer Trennsäulen.....	75
4.5.3	Identifizierung über die RRT.....	81
4.5.4	Identifizierung über das UV-Spektrum	82
4.5.5	Ähnlichkeits- und Identifikationsmatrizen	85
4.5.6	Ableitung der mittleren Selektivität XM.....	89
4.5.7	Vergleichende Bewertung der Selektivitätsparameter	90
4.5.8	Ergebnisse aus der Literatur	95
4.5.9	Ergebnisse dieser Arbeit.....	98
4.5.10	Nicht berücksichtigte Einflussgrößen.....	107
4.6	Spezifität.....	108
4.6.1	Spektroskopische Variabilität als Voraussetzung für Spezifität.....	108
4.6.2	Konzept für eine hierarchische Klassifizierung.....	112
4.6.3	Hauptgruppen	113
4.6.4	Trizyklische Verbindungen	122
4.6.5	Benzodiazepine.....	125
4.6.6	Phenothiazine.....	126
4.6.7	Opiate.....	129
4.6.8	Diphenylmethanderivate.....	130
4.6.9	Barbiturate	131
4.6.10	"Toluolderivate"	132
4.6.11	Steroide vom "Mesityloxidtyp"	136
4.6.12	Steroide vom "Cyclohexadienontyp"	136
4.6.13	Herzglykoside.....	137
4.6.14	Zusammenfassende Diskussion der Klassifizierung	138
4.7	Genauigkeit bei der Quantifizierung.....	140
4.7.1	Anforderungen an die Genauigkeit der Quantifizierung	140
4.7.2	Pipettiergenauigkeit.....	142
4.7.3	Wiederfindung	143
4.7.4	Peakflächen.....	145
4.7.5	Fehler bei den verschiedenen Aufarbeitungen	146
4.8	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	150

5	ANWENDUNGSBEISPIELE.....	153
5.1	Polyintoxikation mit verschiedenen Hypnotika.....	153
5.2	Letale Intoxikation mit Chloroquin in Kombination mit Alkohol und Diphenhydramin.....	155
5.3	Bestimmung flüchtiger Substanzen in einem Todesfall.....	157
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	161
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	164
8	LITERATUR.....	168
9	ANHANG.....	177
9.1	Herleitung der Formel für den Fehler der RRT.....	177
9.2	Substanzlisten.....	179
9.2.1	Substanzen mit ein- oder mehrfachsubstituiertem Phenylchromophor	179
9.2.2	Substanzen mit einfachsubstituiertem Phenylchromophor.....	181
9.3	Tabellierte Ergebnisse der Diskriminanzanalyse	183
9.3.1	Hauptgruppen	183
9.3.2	Trizyklische Verbindungen	184
9.3.3	Benzodiazepine.....	185
9.3.4	Phenothiazine.....	185
9.3.5	Opiate.....	186
9.3.6	Diphenylmethanderivate.....	187
9.3.7	Barbiturate	187
9.3.8	"Toluolderivate"	187
9.3.9	Steroide vom "Cyclohexadienontyp"	189
9.3.10	Herzglykoside.....	189

Abkürzungsverzeichnis

2D-HPTLC	Zweidimensionale Hochleistungsdünnschicht-chromatographie	GC-MS	Gaschromatographie mit massensensitivem Detektor
Ac ₂ O	Acetanhydrid	GC-NPD	Gaschromatographie mit Stickstoff -/ Phosphor-detektor
ACE	Angiotensin Converting Enzyme	GLP	Gute Laborpraxis
ACN	Acetonitril	GTfCh	Ges. f. Toxikologische und Forensische Chemie
ADH	Alkoholdehydrogenase	HOAc	Essigsäure
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	HOMO	Höchstes besetztes Molekülorbital (Highest Occupied Molecular Orbital)
ASCII	American Standard Code for Information Interchange	HP	Hewlett Packard (heute Fa. Agilent Technologies)
A.U.	Flächeneinheiten (area units)	HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
BG	Bestimmungsgrenze	HPLC-DAD	Hochleistungsflüssigchromatographie mit Photodiodenarraydetektion
BuCl	1-Chlorbutan	HPLC-FLD	Hochleistungsflüssigchromatographie mit Fluoreszenzdetektion
BZE	Benzoylcegonin	HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
CAS	Chemical Abstracts Service	HS-GC	Headspace-Gaschromatographie
CD-ROM	Compact Disc - Read Only Memory	HS-SPME	Headspace Solid Phase Microextraction
CE	Kapillarelektrophorese	HU	Humboldt-Universität (Berlin)
CID	Kollisionsinduzierter Zerfall	IBM	International Business Machines (Firma)
CO-Hb	Komplex aus Kohlenmonoxid und Hämoglobin	IBM-PC	IBM-kompatibler Personal Computer
CZE	Kapillarzonelektrophorese	IC	Information Content
DA	Diskriminanzanalyse	ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
DAD	(Photo-)Diodenarraydetektion/-detektor	IEC	International Electrotechnical Commission
DGKC	Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie	INN	International Non-Proprietary Name
DIN	Deutsches Institut für Normung	IOC	International Olympic Committee
DP	Discriminating Power	IP	Identification Power
ΔRT	Absolutfehler von RT	i-PrOH	Isopropanol
ΔT ₀	Absolutfehler von T ₀	IR	Infrarot(-spektroskopie)
EINECS	European Inventory of Existing Chemical Substances	ISO	International Organization for Standardization
El.	Eluent	IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
ELINCS	European List of New Chemical Substances	LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
EMIT	Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique	LC-ESI/ CID-MS	LC-MS mit Elektrosprayionisation / kollisionsinduziertem Zerfall
ESI	Elektrosprayionisation	LC-MS	Flüssigchromatographie mit massensensitiver Detektion
Et ₂ O	Diethylether	ld	Logarithmus zur Basis 2 (dualer Logarithmus)
EtOAc	Ethylacetat	LDA	Lineare Diskriminanzanalyse nach Fisher
FDA	Flexible Diskriminanzanalyse	LL	Listenlänge
FIA-MS-MS	Fließinjektionsanalyse mit zweidimensionaler massensensitiver Detektion	LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (Liquid Liquid Extraction)
FLD	Fluoreszenzdetektor		
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie		
GC	Gaschromatographie		
GC-FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor		

LM	Lösungsmittel	SDA	Schrittweise Diskriminanzanalyse
λ_{\max}	Wellenlänge maximaler Extinktion (im UV-Spektrum)	sec	Sekunde(n)
LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)	SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlusschromatographie)
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie	SI	Similarity Index
MeOH	Methanol	SIMCA	Soft Independent Modelling of Class Analogies
MLL	Mean List Length	SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
MPPH	5-(p-Methylphenyl)-5-phenylhydantoin	SPME	Festphasenmikroextraktion
MS	Massensensitive(r) Detektion/Detektor	SPME-MS	Festphasenmikroextraktion mit massensensitiver Detektion
MTA	Medizinisch-Technische(r) Assistent(in)	SPP	Sequential Projection Pursuit
MTBE	t-Butylmethylether	SPS	Semipermeable Surface
NG	Nachweisgrenze	SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Statistiksoftware)
NIR	Nahes Infrarot(licht)	STA	Systematische Toxikologische Analyse
NIST	National Institute of Standards and Technology (USA)	SW	Schwellenwert
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	T_0	chromatographische Totzeit
OECD	Organization for Economical Co-Operation and Development	TDM	Therapeutic Drug Monitoring
PAK	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe	THC	Tetrahydrocannabinol
PCA	Hauptkomponentenanalyse (principle component analysis)	TIAFT	The International Association of Forensic Toxicologists
PCB	Polychlorierte Biphenyle	TLC	Dünnschichtchromatographie (Thin Layer Chromatography)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration	UV	Ultraviolett(er Teil des elektromagnetischen Spektrums), UV-Spektroskopie
pK_a	Negativer dekadischer Logarithmus der Säuredissoziationskonstanten	VIS	Sichtbares Licht (Visible Light)
PLS	Partial Least Squares	VK	Variationskoeffizient
p-PBP	4-Phenylbenzophenon	WF	Wiederfindung(srate)
PSE	Periodensystem der Elemente	Ξ	Selektivität nach Kaiser
QM	Qualitätsmanagement	XM	Mittlere Selektivität
QSAR	Qualitative Struktur-Wirkungs-Beziehung(en) (Qualitative Structure-Activity-Relationships)	ZNS	Zentrales Nervensystem
RAM	Restricted-Access-Medium		
RDA	Regularisierte Diskriminanzanalyse		
R_f	Dünnschichtchromatographische Laufstrecke im Verhältnis zur Lösungsmittelfront		
RI	Retentionsindex		
RIP	Relative Identification Power		
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)		
RRT	Relative Retentionszeit (Relative Retention Time)		
RT	Absolute Retentionszeit (Absolute Retention Time)		
s	experimentell ermittelte Standardabweichung		
σ	Theoretische Standardabweichung bei unendlich großer Stichprobenanzahl		

Danksagung

Mein fachlicher Dank geht an:

- Den Institutsdirektor Prof. Dr. Gunther Geserick für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Rechtsmedizin der HU Berlin,
- Prof. Dr. Fritz Pragst für die Bereitstellung des Promotionsthemas, die intensive fachliche Betreuung und die interessante Zeit in der Abteilung Toxikologische Chemie des Instituts für Rechtsmedizin der Charité,
- Prof. Dr. Michael Linscheid für die Betreuung dieser Arbeit,
- Dr. Sieglinde Herre, Sibylle Menzel, Katrin Malzacher, Ingo Fechner und Markus Witteweg für die Mitarbeit bei der Messung und Auswertung der Spektrenbibliothek,
- Herrn Wohlauf vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) für die Gelegenheit einer Messung am HP-1100-Photodiodenarraydetektor
- sowie Dr. Waldemar Wlodarczyk von der Abteilung Strahlenphysik der Strahlenklinik des Universitätsklinikums Charité am Campus Virchow-Klinikum für die freundliche Bereitstellung eines MatLab-Arbeitsplatzes.

Persönlich möchte ich mich besonders bedanken bei:

- meiner Frau, Dr. Martina Herzler, die mich trotz eigener, anstrengender Berufstätigkeit während meines Postgradualstudiums und dieser Promotion in außerordentlicher Weise unterstützt und mir gerade in schwierigen Phasen selbstlos den Rücken freigehalten hat,
- meinen Eltern für ihre Unterstützung meines Chemiestudiums, insbesondere aber bei meiner Mutter, Frauke Herzler, die durch ihre umfangreiche Hilfe bei der Kinderbetreuung ebenfalls einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet hat,
- Prof. Dr. Fritz Pragst für die auch auf der zwischenmenschlichen Ebene immer faire und angenehme Zusammenarbeit,
- allen Kolleginnen und Kollegen der Abt. Toxikologische Chemie, insbesondere aber bei Dr. Frank Sporkert und Volker Auwärter, für die nette Zeit in der Abteilung
- und, last but not least, bei Sebastian Rauch für die schönen Tage in unserem gemeinsamen Chemiestudium.

Auch noch bei anderen Dingen genügt nicht die eine Erklärung,
Wo es noch mehrere gibt, von denen doch eine muss wahr sein.
Siehst du zum Beispiel selber den Leichnam eines Gestorbenen
Aus der Ferne wo liegen, so wird von den Gründen des Todes
Meist nur ein einz'ger genannt; doch sollte man sämtlich sie nennen.

Lukrez (Titus Lucretius Carus, 99 – 55 v.Chr.):

Von der Natur der Dinge (De rerum natura) [1]

1 EINLEITUNG

In einer modernen Industrienation wie der Bundesrepublik Deutschland stellen (vermutete und tatsächliche) akute Vergiftungen ein alltägliches Vorkommnis dar. Allein der Giftnotruf Berlin (nur eine von neun Beratungsstellen in Deutschland) verzeichnete im Zeitraum von 1989 - 1999 397.908 Anfragen zu Vergiftungsunfällen bei Kindern bis zu 14 Jahren und 141.683 bei Erwachsenen, dies sind zusammen ca. 150 pro Tag [2]. Bundesweit wurden derselben Quelle zufolge allein bei Kleinkindern in den Jahren 1995 - 1997 jährlich ca. 100.000 Ingestionsunfälle registriert. In ca. 10 % der Fälle wurden tatsächlich Vergiftungssymptome beobachtet, ca. 500 verliefen lebensgefährlich, zwischen 20 und 40 davon mit tödlichem Ausgang.

Einer anderen Untersuchung aus dem Jahre 1995 [3] zufolge werden in Deutschland jährlich schätzungsweise 200.000 Patienten mit Vergiftungsverdacht stationär aufgenommen, davon kommt für ca. 1.600 Menschen die Hilfe zu spät. Zusammen mit bereits tot aufgefundenen Vergiftungsopfern wird die Zahl der tödlichen akuten Vergiftungen insgesamt auf ca. 4.000 bis 5.000 Fälle pro Jahr geschätzt. Aufgrund der allgemein niedrigen Obduktionsquote in Deutschland könnte diese Zahl tatsächlich noch um einiges höher und somit in der Größenordnung der jährlichen Verkehrstotenzahlen liegen.

Die insgesamt erfreulich hohe Überlebensrate bei Einlieferung in ein Krankenhaus kann ohne eine effektive chemisch-toxikologische Analytik nicht gewährleistet werden. Diese sieht sich dabei häufig vor die Aufgabe gestellt, insbesondere bei unklarer Vergiftungsursache innerhalb kürzester Zeit die vergiftungsrelevanten Wirkstoffe nicht nur zu finden, sondern nach Möglichkeit auch noch die aufgenommenen Mengen wenigstens semiquantitativ abzuschätzen. Qualitativ oder quantitativ irrelevante Substanzen sollen andererseits sicher abgegrenzt werden können. Allgemein wird eine solche Suche nach der "Nadel im Heuhaufen" als ungerichtete Suchanalyse (häufiger neudeutsch: "General-Unknown-Analyse"), bzw. als "Systematische Toxikologische Analyse" (STA) bezeichnet. Sie wird von vielen als "Königdisziplin" der forensisch-toxikologischen Analytik angesehen, da sie außerordentliche Anforderungen an Probenaufarbeitung und Analytik stellt [4,5].

Im Mittelpunkt der STA-Suchstrategien stehen heute Kombinationen leistungsfähiger chromatographischer Trennverfahren mit hochselektiven Detektoren, vor allem die Hochleistungsflüssigchromatographie mit Photodiodenarraydetektor (HPLC-DAD) und die Kapillargaschromatographie mit massenselektivem Detektor (GC-MS). Für den Einsatz dieser Techniken in der STA werden gleichzeitig umfangreiche Referenzdatenbanken, sog. Spektrenbibliotheken, benötigt. Diese müssen sowohl im Hinblick auf die enthaltenen Substanzen, als auch bezüglich der Qualität der Messdaten ständig auf dem neuesten Stand gehalten werden.

Den Kern der vorliegenden Arbeit bildete die vollständige Neumessung einer im zehnjährigen Routineeinsatz in der Abteilung Toxikologische Chemie des Instituts für Rechtsmedizin der HU Berlin bewährten Bibliothek von UV-Spektren und (relativen) Retentionszeiten toxikologisch relevanter Verbindungen für die Analyse mittels HPLC-DAD. Sie war durch den erheblichen technischen Fortschritt, insbesondere bei der spektralen Auflösung der Photodiodenarraydetektoren [6], erforderlich geworden. Gleichzeitig wurde der Substanzbestand um fast zwei

Drittel von ca. 1.700 auf fast 2.700 UV-aktive Wirkstoffe ausgebaut und aktualisiert. Die Spektrenbibliothek ist mittlerweile auch kommerziell erhältlich (Buch + CD-ROM, [7]) und stellt mutmaßlich die derzeit weltweit größte UV-Spektrenbibliothek für die HPLC dar.

Angesichts der erheblichen Bedeutung der Messergebnisse für die Wahl der eingeleiteten Therapiemaßnahmen bei klinischen Untersuchungen, aber auch im Hinblick auf die juristischen Auswirkungen für die Betroffenen bei forensischen Fällen ist das Thema Qualitätsmanagement (QM) auch in der forensisch-toxikologischen Chemie in den letzten Jahren zunehmend ins Blickfeld gerückt. Neben den organisatorischen (personellen, räumlichen, apparativen) Anforderungen an Prüflaboratorien und dem formalen Prozedere einer Akkreditierung werden dabei vor allem die Qualitätsansprüche diskutiert, die im Rahmen der Forensik an ein Analysenverfahren gestellt werden müssen. Auch die Überprüfung einer Methode hinsichtlich der Einhaltung der geforderten Qualitätskriterien (Validierung) muss ihrerseits nach einheitlich akzeptierten Regeln erfolgen. Die Grundlage hierfür bilden Normen und Richtlinien, die allgemein für pharmazeutische und bioanalytische Nachweisverfahren entwickelt wurden und durch die wichtigsten internationalen Zulassungsbehörden anerkannt wurden.

Vor diesem Hintergrund zieht sich das Thema Validierung als roter Faden durch die vorliegende Arbeit. Zunächst sollten an die Verhältnisse bei der STA angepasste Anforderungen für eine Methodenvalidierung festgelegt werden. Auf dieser Grundlage sollte dann ein möglichst umfassendes Bild von der Leistungsfähigkeit der eingesetzten HPLC-DAD-Methode im Kontext der STA erstellt werden, um zu Aussagen über die grundsätzliche Eignung und gegebenenfalls die Grenzen des Verfahrens zu gelangen. Eine wichtige Zielstellung bestand dabei darin, bislang eher empirische Erkenntnisse aus der täglichen Anwendung mit wissenschaftlichen Methoden zu verifizieren.

Im Rahmen einer HPLC-DAD-Messung fallen große Datenmengen an, die nur noch auf elektronischem Wege verarbeitet werden können. Mit dem Einzug kostengünstiger und leistungsstarker Rechner in die analytischen Labore stehen heute für einen breiten Anwenderkreis Methoden für die Ausbeutung umfangreicher, multivariater Datensätze ("data mining") bereit, die einen Schwerpunkt des vergleichsweise neuen und in starkem Wachstum begriffenen Gebietes der Chemometrie bilden. Im Bereich der forensischen Toxikologie wurde bisher allerdings kaum über den Einsatz solcher Verfahren berichtet, was sicher auch auf den z. T. komplexen und nicht immer sofort eingängigen mathematischen Hintergrund zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der multivariaten Statistik, insbesondere auch von gruppierenden und klassifizierenden Verfahren, ausgelotet und beispielhaft demonstriert werden. Mit ihrer Hilfe kann nicht nur der größte "Schatz" der forensisch-toxikologischen Forschung, das durch das vielseitige Aufgabengebiet anfallende, sehr umfangreiche und einzigartige Datenmaterial, besser erschlossen werden, sie ermöglichen dem anwendenden Labor auch den Aufbau eines ständig erweiterbaren, eigenen "Expertensystems" durch die systematische Einordnung neuer Erkenntnisse in den vorhandenen Wissensstand.

Insgesamt bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, das für die Systematische Toxikologische Analyse in der Vergangenheit bewährte HPLC-DAD-Verfahren in Bezug auf die

Spektrenbibliothek inhaltlich und technisch auf den neuesten Stand zu bringen, es systematisch auf seine analytisch-chemische Leistungsfähigkeit sowie auf die Tauglichkeit im Hinblick auf zeitgemäße Qualitätsanforderungen hin zu überprüfen und seine Möglichkeiten durch den Einsatz moderner Datenverarbeitungsverfahren zu erweitern.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Die Systematische Toxikologische Analyse

2.1.1 Zum Begriff der STA

Während der Begriff der General-Unknown-Analyse vor allem auf den Anspruch verweist, den in Frage kommenden Substanzkreis möglichst unvoreingenommen, gleichwertig und vollständig analytisch zu erfassen, schließt die Bezeichnung "Systematische Toxikologische Analyse" vor allem auch das gerichtete, logisch-schematische Konzept hierfür mit ein [8]. Nach de Zeeuw [4] ist die STA definiert als die "...logische, chemisch-analytische Suche nach potenziell schädlichen Substanzen, deren Anwesenheit (in der Probe) nicht gesichert und deren Identität unbekannt ist." ¹ Davon abzugrenzen ist der weit verbreitete Begriff des Screenings, der die Bestimmung einer oder mehrerer hinsichtlich ihrer Identität bekannter Komponenten in einer größeren Anzahl von Proben bezeichnet [9].

Zum Konzept der STA wurden seit den 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, seit 1978 besteht das "Committee on Systematic Toxicological Analysis and Guidelines" der Fachgesellschaft TIAFT (The International Association of Forensic Toxicologists) [9].

Die STA kommt im Rahmen der Notfallmedizin dann zum Einsatz, wenn die Ursachen einer vermuteten Vergiftung unbekannt sind. Sie wird in der Rechtsmedizin ebenfalls dann angewendet, wenn der pathologische Obduktionsbefund keine eindeutige Todesursache erbringen konnte. Bei Verdachtsmomenten, die sich aus der Anamnese im Krankenhaus oder aus den polizeilichen Ermittlungsakten (aufgefundene Medikamente, Zeugenaussagen) ergeben, wird die STA durch den Einsatz gerichteter Analysenverfahren ergänzt (s. Abschnitt 2.1.3).

Auch dann, wenn konkrete Angaben über eingenommene Substanzen vorliegen, ist neben der gezielten chemischen Bestimmung die Durchführung einer STA dringend angeraten: so stellten Köppel und Tenczer in einer Untersuchung [10] fest, dass sich bei der Aufnahme ins Krankenhaus die Angaben von Seiten der Patienten selbst oder von Angehörigen in bis zu 40 % der Fälle als falsch oder zumindest unvollständig erwiesen. Dies wird durch Maurer [5] bestätigt, er weist zusätzlich darauf hin, dass bestimmte Vergiftungen oft nur schwer allein anhand der klinischen Symptome erkannt werden können, dass Gifte mit ausgeprägter Symptomatik solche mit zunächst weniger deutlicher Verlaufsform überdecken können und dass Vergiftungen mit primär schwacher Symptomatik teilweise klinisch erst dann auffällig werden, wenn bereits irreversible Schädigungen vorliegen. Der Autor plädiert daher für die Durchführung einer General-Unknown-Analyse bei jedem Vergiftungsverdacht. De Zeeuw [11] stellt fest, dass Vergiftungen mit einem Gemisch verschiedener Wirkstoffe eher die Regel als die Ausnahme darstellten.

Darüber hinaus ist eine ungerichtete Suchanalyse nicht nur bei akutem Vergiftungsverdacht sinnvoll: Parquet et al. [12] verglichen die Angaben von 50 zur Drogenentwöhnung stationär

¹ In der vorliegenden Arbeit wurden alle wörtlichen Zitate aus englischsprachigen Veröffentlichungen durch den Verfasser ins Deutsche übersetzt.

aufgenommenen Patienten bei der Aufnahme im Krankenhaus mit den Ergebnissen ihrer Analysen und fanden in 52 % der Fälle neben den angegebenen noch weitere relevante Wirkstoffe. Sie plädieren daher für den Einsatz der STA auch im Rahmen der Entzugsbehandlung und von epidemiologischen Studien zur Drogenabhängigkeit.

De Zeeuw [11] teilt die Systematische Toxikologische Analyse in drei Phasen ein; in jeder Phase werden spezifische Ansprüche an ein erfolgreiches STA-Konzept gestellt. Hierbei umfasst Phase 1 die Probenaufarbeitung, -isolierung und -konzentration, es sollen alle relevanten Substanzen erfasst, sämtliche störenden Matrixinterferenzen und irrelevanten Komponenten jedoch nach Möglichkeit entfernt werden. Phase 2 besteht aus Auftrennung und Detektion, die mit optimaler Sensitivität, mit einem Minimum an Zeit, möglichst selektiv, gleichzeitig jedoch mit maximaler Universalität der Detektion durchzuführen sind. Für Phase 3, die Identifikation, ist vor allem die hohe Qualität der verwendeten Referenzdatenbanken maßgeblich.

2.1.2 Toxikologische Relevanz

In der sog. CAS Registry des Chemical Abstracts Service werden derzeit mehr als 20 Millionen bekannte organische und anorganische Substanzen und noch einmal so viele Proteinsequenzen geführt, täglich kommen etwa 4.000 Neueinträge hinzu (<http://www.cas.org/cgi-bin/regreport.pl>, Stand: 11. August 2002). Die CHEMCATS-Datenbank desselben Anbieters (<http://www.cas.org/CASFILES/chemcats.html>) enthält mehr als 4,4 Millionen kommerziell erhältliche chemische Produkte (nicht notwendigerweise verschiedene Chemikalien). Alt- und Neustoffverzeichnis der in der EU im Verkehr befindlichen Substanzen (Datenbanken EINECS bzw. ELINCS) umfassen zusammen über 100.000 Einträge (<http://www.silverplatter.com>). Im Standardwerk "Organic-Chemical Drugs and their Synonyms" [13] werden über 16.000 chemisch einzigartige Medikamentwirkstoffe mit insgesamt annähernd 130.000 Synonymen aufgeführt, davon sind in Deutschland laut [14] derzeit ca. 3.000 zugelassen. Das "Pesticide Manual" [15] listet mehr als 800 weltweit aktuell eingesetzte Pestizide auf, zusätzlich sind fast 600 mittlerweile nicht mehr auf dem Markt erhältliche Wirkstoffe enthalten.

Angesichts dieser Zahlen stellt sich die Frage, welche und wieviele Substanzen im engeren Sinne toxikologisch relevant sind und demnach in den entsprechenden Referenzdatenbanken unbedingt enthalten sein sollten. Müller und Thieme [16] haben darauf hingewiesen, dass dies vor allem eine Frage der Abwägung von Wahrscheinlichkeiten ist. Es ist sicherlich völlig unmöglich, für jedes "exotische" und deshalb eher unwahrscheinliche Gift eine entsprechende Bestimmungsmethode vorzuhalten. Gleichzeitig muss die Frage gestellt werden, welcher Prozentsatz an falsch negativen (und damit möglicherweise fatalen) Befunden als zumutbar angesehen wird.

Unstrittig "wahrscheinlich" und daher relevant ist sicherlich die Gruppe derjenigen Substanzen, die regelmäßig im Rahmen der toxikologischen Analyse gefunden werden. Nach [2] dominierten 1999 bei den in suizidaler Absicht herbeigeführten Vergiftungen klar die Medikamentwirkstoffe, wobei knapp 30 % dieser Fälle auf die Einnahme von Benzodiazepinen (Tranquilizern), Trizyklischen Antidepressiva oder Antihistaminika zurückzuführen waren. In über 40 % der Fälle wurde jedoch eine Vielzahl anderer Medikamente (einzeln oder als Mischintoxikation)

gefunden. Bei den akzidentellen Vergiftungen (vorwiegend im Kindesalter) standen dagegen noch vor den Medikamenten vor allem sog. "Publikumsmittel" (Reinigungskemikalien, Kosmetika etc.) im Vordergrund.

Ein weiteres Wahrscheinlichkeitskriterium für die toxikologische Relevanz stellt die Verbreitung bzw. Verfügbarkeit der betrachteten Verbindungen dar. Es darf angenommen werden, dass ein Großteil der oben genannten Substanzen der Allgemeinheit nicht zur Verfügung steht oder aber nicht vergiftungsrelevant ist. Gleichzeitig muss beachtet werden, dass in privaten Haushalten Medikamente, aber auch Schädlings- und Unkrautvernichtungsmittel oft noch lange Zeit über ihre Zulassung hinaus aufbewahrt werden und in kritischen Situationen spontan für Suizidversuche genutzt werden können. Die verstärkte Reisetätigkeit in einer globalisierten Welt führt darüber hinaus auch zur Einführung von Substanzen, die auf dem heimischen Markt gar nicht bekannt sind. Insofern sind nach Möglichkeit auch Bestimmungsmethoden für veraltete oder nicht überall zugelassene Verbindungen vorzuhalten.

Andererseits muss eine STA-Methode auch nicht sämtliche relevanten Substanzen erfassen. Köppel und Tenczer schreiben hierzu [10]: "Die Einbeziehung einiger spezieller Substanzen wie Ethanol, flüchtiger Stoffe, von Digitalisglykosiden oder Schwermetallen in eine solche universelle Prozedur ist nicht notwendig. In der Praxis stellt der Nachweis dieser Verbindungen kein größeres Problem dar, da von den meisten Krankenhauslaboratorien die Bestimmung von Ethanol, Digitoxin oder Digoxin routinemäßig durchgeführt wird, während die Toxizität von Schwermetallen typischerweise in Bezug auf die Symptomatik so spezifisch ist, dass die Diagnose kaum zu übersehen ist."

Insgesamt wird die Anzahl der im engeren Sinne toxikologisch bedeutsamen Substanzen immerhin noch auf mehrere Tausend geschätzt [8]. Hinzu kommen vermutlich noch einmal so viele Begleitstoffe (toxikologisch irrelevante Medikamentwirk- und -beistoffe, Kosmetika, Umweltchemikalien etc. [4]), ebenso wie probeneigene Matrixbestandteile [17], die in den gängigen Analysenverfahren ebenfalls Signale liefern können und deren Identifikation in einer Probe auch im Hinblick auf den Ausschluss einer Vergiftung wünschenswert ist. Müller et al. [17] schätzen die Anzahl potenzieller Störsubstanzen aus der Matrix auf ca. 1.000 - 3.000, wenn auch Autolyseprozesse bei Leichen berücksichtigt werden (über die besonderen Probleme bei der Post-Mortem-Analyse s. [18]).

An den rechtsmedizinischen Instituten richtet sich das Hauptaugenmerk der STA i. d. R. auf die Suche nach organischen Wirkstoffen. Geräte für die anorganische Analyse werden aus Gründen der Wirtschaftlichkeit meist nicht vorgehalten, entsprechende Proben werden im Bedarfsfall an spezialisierte Institute abgegeben. Die Größenordnung des zu bestimmenden Substanzkreises wird hierdurch jedoch nur unmaßgeblich verringert.

Eine vollständige und verbindliche Liste toxikologisch relevanter Verbindungen steht nach wie vor aus (und stellt wohl an sich schon eine Utopie dar). Müller et al. schlagen vor, eine solche Liste auf der Basis einer Festlegung relevanter Substanzklassen nach dem Vorbild der "Dopingliste" des Internationalen Olympischen Komitees zu erstellen [19]. Selbst wenn dies gelänge, bedürfte eine derartige Zusammenstellung jedoch ständiger Aktualisierung.

2.1.3 Gesamtstrategie für die STA

Der Ablauf einer Systematischen Toxikologischen Analyse in der Abt. Toxikologische Chemie des Instituts für Rechtsmedizin der HU Berlin ist in Abb. 1 dargestellt.

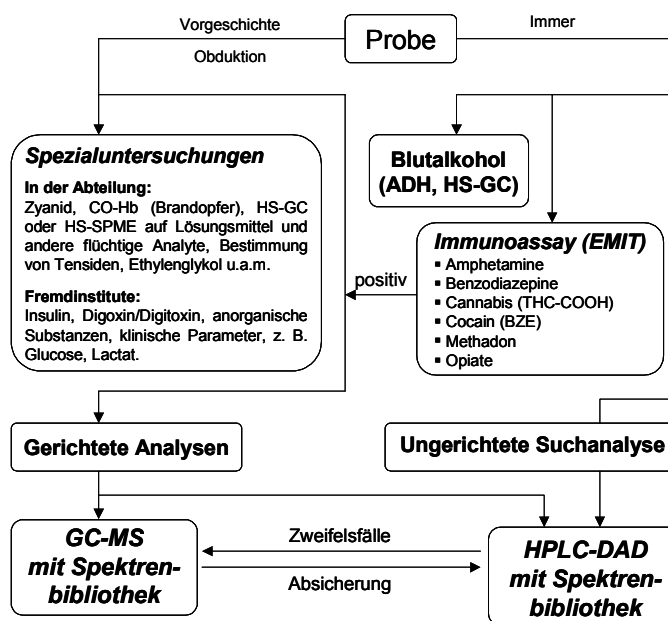


Abb. 1: Schema des STA-Konzeptes am Institut für Rechtsmedizin der HU Berlin. Erläuterung im Text.

Wie bereits erwähnt, führen Hinweise aus der Vorgeschichte zu begleitenden, gerichteten Analysen, die je nach Substanz mit GC-MS oder HPLC-DAD durchgeführt werden. Einige Spezialuntersuchungen (Digoxin/Digitoxin, Insulin) werden im Verdachtsfall auch an Fremd-institute vergeben. Der eigentlichen General-Unknown-Analyse wird ein Screening mittels Immunoassay auf die wichtigsten Wirkstoffgruppen (Illegale Drogen, Benzodiazepine) vorge-schaltet. Positive Befunde werden ggf. durch ein methodisch unabhängiges Zweitverfahren (GC-MS für die Drogen, HPLC-DAD z. B. für die Benzodiazepine) abgesichert. Zusätzlich wird generell die Blutalkoholkonzentration mittels zweier unabhängiger Verfahren (Headspace-Gaschromatographie und ADH-Verfahren) bestimmt.

Die ungerichtete Suchanalyse erfolgt, sofern verfügbar, aus Vollblut, Plasma oder Serum, alter-nativ oder zusätzlich aus Urin oder aus Organproben. Blutproben bieten den Vorteil, dass sie die zum Zeitpunkt der Probennahme bzw. des Todeseintritts aktuell wirksamen Konzentrationen besser widerspiegeln. Auf dieser Grundlage kann meist unter Zuhilfenahme pharmakokinetischer Vergleichsdaten der Schweregrad einer Vergiftung in etwa abgeschätzt werden. Diese Daten sind zumindest für Medikamentwirkstoffe fast immer zugänglich. Gleichzeitig ist Blut, anders als Urin, zumindest in der Notfallmedizin so gut wie immer verfügbar. Urin ist als zusätzliches Untersuchungsgut insofern interessant, als dass hier meist höhere Substanzkonzentrationen sowie eine größere Zahl von Metaboliten gefunden werden, so dass die zurückliegende Einnahme auch solcher Substanzen belegt werden kann, die im Blut nur kurze Halbwertszeiten aufweisen.

Als Analysenverfahren für die ungerichtete Suchanalyse standen im Prinzip sowohl GC-MS als auch HPLC-DAD zur Verfügung. Insgesamt wurde vor allem aufgrund der einfachen Probenaufarbeitung und der größeren Robustheit der HPLC-Methode der Vorzug gegeben, gerade vor dem Hintergrund einer ständigen Einsatzbereitschaft der Anlagen auch im nächtlichen Bereitschaftsdienst der Abteilung. Die Vor- und Nachteile von GC-MS und HPLC-DAD sowie weiterer Analysenverfahren im Kontext der STA werden im Abschnitt 2.1.5 dargestellt. Eine genauere Beschreibung des eingesetzten HPLC-Verfahrens findet sich im Abschnitt 3.1.

Aufgrund der oft komplizierten Sachlage bei Vergiftungsfällen ergeht der eigentliche Befund, insbesondere im Hinblick auf den Schweregrad einer Vergiftung, erst nach Würdigung aller im Rahmen der STA-Prozedur gewonnenen Erkenntnisse. Der Abgleich der Analysenergebnisse mit der jeweiligen Vorgeschichte im Rahmen einer Plausibilitätsbetrachtung hat sich hierbei als unerlässlich herausgestellt.

2.1.4 Literatur zur Probenaufarbeitung für die STA

Der Einteilung der Systematischen Toxikologischen Analyse in drei Phasen nach de Zeeuw ([11], s. Abschnitt 2.1.1) folgend soll zunächst eine kurze Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Probenaufarbeitung für die STA gegeben werden. Diese sind auf die Anforderungen der nachfolgend durchgeführten Analysenverfahren zugeschnitten, daher werden letztere in den folgenden Tabellen mit angegeben. Tab. 1 enthält Verfahren auf der Basis der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE).

Tab. 1: General-Unknown-Verfahren aus der Literatur auf der Basis der Flüssig-Flüssig-Extraktion. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis.

Quelle, Jahr	Matrix	Vol. / Menge	Verfahren	Trennung / Detektion
[20], 1990	Vollblut	0,25 ml	Fällung mit Acetonitril, zentrifugieren.	HPLC-DAD
[21], 1990	Organe	5 g	Ultraschallbad, Extraktextraktion mit CH ₂ Cl ₂ bzw. CHCl ₃ , abdampfen, wieder aufnehmen.	TLC
[22], 1992	Postmortales Blut	2 ml	LLE mit Toluol. Extraktion und Reextraktion in mehreren Schritten bei wechselndem pH, eindampfen und in mobiler Phase aufnehmen.	HPLC-DAD
[23], 1993	Urin	5 ml	Enzymatische Hydrolyse, Zugabe gesättigter Tartratlösung, LLE erst mit 30, anschließend noch einmal mit 20 ml MTBE, Trocknung über Na ₂ SO ₄ , abdampfen, wieder aufnehmen.	2D-HPTLC
[24], 1995	Vollblut, Plasma	2 ml	Zugabe von Puffer (NH ₄ Cl), LLE mit CHCl ₃ / i-PrOH / n-Heptan (60:14:26), eindampfen, aufnehmen.	HPLC-DAD
[25], 1995	Blut, Urin, Mageninhalt, Gewebe	1 ml / 1 g	Urin: Hydrolyse, Alle: LLE mit n-Hexan/EtOAc (7:3), zentrifugieren, eindampfen, aufnehmen.	HPLC-DAD
[26], 1997	Urin	5 ml	LLE mit Toxitube A (Carbonatpuffer / Dichlorethan / CH ₂ Cl ₂).	HPLC-DAD
[27] / [28], 1990 / 1997	Urin	10 ml	Kochen mit 3 ml konz. HCl, dann alkalisieren und auf pH 8 - 9 puffern. Alternativ: Mikrowellenbestrahlung. LLE mit 10 ml CH ₂ Cl ₂ / i-PrOH / EtOAc (1:1:3), zur Trockne eindampfen, aufnehmen in Ac ₂ O/Pyridin (3:2) und 30 min bei 60 °C acetylieren, abdampfen, aufnehmen (MeOH).	GC-MS
[29], 1997	Blut	1 ml	Zusatz von NH ₄ Cl, LLE mit EtOAc, eindampfen, aufnehmen in ACN, Reextraktion organischer Verunreinigungen mit n-Hexan.	HPLC-DAD GC-FID

Fortsetzung Tab. 1

Quelle, Jahr	Matrix	Vol. / Menge	Verfahren	Trennung / Detektion
[30], 1998	Serum	1 ml	Pufferzugabe, LLE mit 4 ml 1,2-Dichlorethan / CH ₂ Cl ₂ / Heptan / i-PrOH (96:52:132:20), abdampfen, aufnehmen in Gemisch aus MeOH, ACN und einer Lösung eines Ionenpaarreagenzes.	HPLC-DAD
[31], 1998	Serum	n. a.	Zugabe von Puffer, LLE mit EtOAc, BuCl, MTBE.	HPLC-DAD GC-MS
[32], 2000	Plasma, Mageninhalt	1 bzw. 5 ml	Zugabe von 5 ml gesättigter Na ₂ SO ₄ , LLE mit 2 x 5 ml Et ₂ O/EtOAc (1:1), eindampfen, aufnehmen in MeOH.	GC-MS
	Urin	5 ml	Saure Hydrolyse einer Hälfte der Probe unter Rückfluss, dann basisch einstellen und zweite Hälfte zugeben, LLE mit CH ₂ Cl ₂ / i-PrOH / EtOAc (1:1:3), acetylieren mit Ac ₂ O/Pyridin.	GC-MS
[33], 2001	Serum, Urin	1 ml	Zugabe von 0,5 ml ACN (Serum), dann 100 µl 2M HCl bzw. 2M NaOH, LLE mit 6 ml CH ₂ Cl ₂ . Eindampfen, aufnehmen in 100 µl Eluent.	CZE / MEKC
[34], 2002	Blut, Serum, Plasma	0,5 ml	Zugabe von 0,4 ml ACN und 100 µl Puffer (wahlweise Tris-Puffer pH 9 oder Phosphatpuffer pH 2,3, meist beide Ansätze), vortexen, eindampfen, aufnehmen in 100 µl mobiler Phase.	HPLC-DAD

Neben der Zahl der erfassten Verbindungen stellt auch die Sauberkeit der Extrakte in Bezug auf störende Matrixkomponenten ein wichtiges Kriterium der Eignung eines LLE-Verfahrens für die STA dar. Demme et al. [35] untersuchten die Sauberkeit von Flüssig-Flüssig-Extrakten unterschiedlicher Extraktionsmittel mit TLC, GC-MS und HPLC-DAD. 1-Chlorbutan wird wegen der Sauberkeit der Extrakte (kleinste Gesamtfläche der Störpeaks) empfohlen, kann dafür aber einige wichtige Verbindungen nicht erfassen.

In Tab. 2 sind in der Literatur beschriebene Aufarbeitungsverfahren auf der Grundlage der Festphasenextraktion (SPE) aufgeführt. Die Probenvorbereitung läuft dabei i. d. R. nach folgendem Muster ab: bei Bestimmungen aus Urin werden meist die metabolischen Konjugate (Glucuronide etc.) gespalten, bei Organproben wird die Probe vorbereitend homogenisiert. Nach Zugabe eines internen Standards wird die Probe durch Pufferzusatz verdünnt, der pH wird eingestellt. Anschließend erfolgt die Elution oft in zwei Schritten: zuerst sauer/neutral, dann basisch. Für die Analyse mittels GC-MS schließen sich ein oder mehrere Derivatisierungsschritte an. Zum Einsatz kommen in der überwiegenden Zahl der Fälle mischfunktionelle Säulen, deren stationäre Phase aus einem Gemisch von C₈- und C₁₈-Phasen einerseits und andererseits einem Kationenaustauscher besteht.

Tab. 2: General-Unknown-Verfahren aus der Literatur auf der Basis der Festphasenextraktion. Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis.

Quelle, Jahr	Matrix	Vol. / Menge	Verwendete Säule(n)	Detektion
[36], 1990	Vollblut	1 ml	Bond Elut Certify	GC-FID
[37], 1991	Plasma	1 ml	Bakerbond C18	GC-MS
[38], 1992	Vollblut	1 ml	Bond Elut Certify und Clean Screen DAU	GC-FID
[39], 1992	Serum	2 ml	Bond Elut Certify und Bakerbond C ₁₈	HPLC-DAD
[40], 1993	Plasma, Vollblut	1,2 ml	Bond Elut Certify	GC-FID
[23], 1993	Vollblut, Urin	2 ml (Blut) 5 ml (Urin)	Bond Elut Certify	2D-HPTLC

Fortsetzung Tab. 2

Quelle, Jahr	Matrix	Vol. / Menge	Verwendete Säule(n)	Detektion
[41], 1994	Leberhomogenisat	0,4 ml	Bond Elut Certify	GC-FID, GC-NPD
[42], 1995	Blut	0,2 ml	Bond Elut Certify II	MEKC
[43], 1995	Blut	1 ml	diverse	GC-NPD
[44,45], 1995/1998	Vollblut	1 ml	Bond Elut Certify und Clean Screen DAU	GC-MS
[46], 1996	Plasma, Vollblut	1 ml	Bond Elut Certify	HPLC-UV
[47], 1997	Hirn, Mageninhalt (Ratte), Homogenisat	1 g	Bakerbond C ₁₈	HPLC-FLD bzw. GC-MS
[48], 1997	Serum, Vollblut	1 ml	Bond Elut Certify und Chromabond Drug	GC-MS
[26], 1997	Serum, Urin	3 ml	Bond Elut Certify	HPLC-DAD
[4], 1997	Plasma, Serum, Urin	8 ml	Bond Elut Certify	GC-MS
[49], 1998	Blut, Urin	1 ml	Urin: Vorreinigung mit Bond Elut Certify, SPE (Blut, Urin) mit Isolut HCX	GC-MS
[50-52], 1998-2000	Serum, Urin	0.1 – 2 ml	Chromabond Drug	FIA-MS-MS, GC-MS
[53], 1999	Organproben	1g	Isolute und OASIS	n. a.
[54], 1999	Serum	1 ml	AbsElut Nexus und Bond Elut C ₁₈	LC-MS bzw. GC-MS
[32], 2000	Urin, Plasma	2 ml	SPE (Säule n.n.) nach vorhergehender extraktiver Methylierung	GC-MS
[55], 2000	Blut	bis zu 1 ml	Bond Elut Certify und Absolut	EIA, GC-FID, GC-MS
[56], 2000	Serum, Blut, Urin	0,2 – 1 ml	Bond Elut C ₁₈	LC-MS
[33], 2001	Serum, Urin	1 ml	AbsElut	CZE/MEKC
[57], 2001	Plasma, Urin (Human, Pferd)	1 ml Plasma, 2-3 ml Urin	AbsElut Nexus	HPLC-DAD, GC-MS
[58], 2001	Serum	1 ml	Bakerbond C ₁₈ und SDB, Isolute Confirm HCX	LC-ESI/CID-MS

Die in der Frühzeit der SPE beobachteten starken Schwankungen der Extraktionsleistung von Charge zu Charge scheinen so nicht mehr aufzutreten. Chen et al. [59] untersuchten die Reproduzierbarkeit der Extraktionsausbeuten bei der SPE zwischen verschiedenen Chargen zweier verschiedener Säulen (Bond Elut Certify und Clean Screen DAU) und fanden akzeptable Standardabweichungen $< 9 \%$ bzw. $< 7 \%$.

Auch für den Einsatz der SPE in der STA gilt: "Es gibt kein einzelnes Extraktionsverfahren, das für alle verschiedenen Probenarten und verwendeten Detektionsverfahren optimale Resultate erzielt" [60].

Ein aktueller, sehr umfangreicher Review über SPE-Methoden, nicht nur speziell im Rahmen der STA, findet sich in [61]. Über die Probenaufarbeitung für die Systematische Toxikologische Analyse sind mehrere Reviews und systematische Publikationen publiziert worden [60,62-65]. Ein Standardwerk über die toxikologische Analyse von 1991 widmet sich dem Thema ebenfalls ausführlich [66].

Für die Probenvorbereitung im Bereich der HPLC-Verfahren stellen die sog. Restricted-Access-Materialien (RAM) für die Zukunft eine interessante Alternative dar. Dabei werden mittels einer Säulenschaltung Anreicherungsäulen der eigentlichen Trennsäule vorgeschaltet. Diese

Vorsäulen verbinden die Prinzipien der Größenausschlusschromatographie (SEC), der Festphasenextraktion und der Umkehrphasenchromatographie miteinander. Tab. 3 gibt eine Übersicht über in der Literatur beschriebene Verfahren zur Bestimmung von Medikamentwirkstoffen mit RAM und verwandten Säulen für die Online-Aufreinigung.

Tab. 3: Übersicht über Literatur zur Bestimmung von Medikamentwirkstoffen mittels HPLC unter Verwendung von Restricted-Access-Materialien.

Quelle	Bestimmte Substanz(en)	RAM-Säule	Detektion
[67]	Antiepileptika, Benzodiazepine und Trizyklische Antidepressiva	ADS RP-4	UV bei versch. Wellenlängen (DAD)
[68]	Antiepileptika, Carbamazepin, Coffein, Etosuximid, Primidon, Phenobarbital, Phenytoin, Theobromin und Theophyllin aus Serum / Plasma	ADS RP-18	UV bei versch. Wellenlängen
	5-Hydroxy-3-indolessigsäure und 5-Hydroxytryptamin aus Plasma und Serum	ADS RP-18	FLD, Exc.: 300 nm, Em.: 350 nm
	Epirubicin in Plasma, Urin und Gewebekomogenisat	ADS RP-4	FLD, Exc.: 445 nm, Em.: 560 nm
	8-Methoxypsoralen	ADS RP-8	UV 300 nm
[69]	8-Methoxypsoralen	ADS RP-8	FLD, Exc.: 312 nm, Em.: 540 nm
[70]	Ropivacain und Bupivacain aus Plasma	Regis SPS C ₈	UV 240 nm
[71]	Ropivacain und Bupivacain aus Plasma	ADS RP-18	UV 210 nm
[72,73]	Methotrexat und Metabolite	ADS RP-8	UV 307 nm / Photokt. + FLD ([72])
[74]	Ajmalin, Articaïn, Celiprolol, Detajmium, Lamotrigin, Metoprolol, Oxprenolol, Talinolol, Tiracizin, Triamteren, Trimethoprim	ADS RP-18	UV und FLD bei verschiedenen Wellenlängen
[75]	Propafenon und Metabolit aus Serum	ADS RP-18	DAD 200 – 400 nm, 246 nm
[76]	Ketoprofen aus Pferdeplasma	ADS RP-18	UV 260 nm
[77]	Atenolol aus Urin und Serum	ADS RP-18	FLD, Exc.: 230 nm, Em.: 310 nm
[78]	Artemisinin aus Plasma und Speichel	ADS RP-18	Nachsäulenderivatisierung mit KOH, UV 289 nm
[79]	Atenolol, Pindolol, Propranolol aus Plasma, Blut und Mikrodialysat	ADS RP-8	DAD
	Propranolol (Enantiomere)	ADS RP-18	FLD, Exc.: 290 nm, Em.: 340 nm
[80]	Flunitrazepam und Metabolite	ADS RP-18 Biotrap MS 500	UV 245 nm
[81]	Clenbuterol, Salbutamol	Pinkerton ISRP Regis SPS ADS RP-18	UV 280 nm
[82]	Clonazepam, Diazepam, Flunitrazepam, Midazolam, Oxazepam	Biotrap 500 MS	UV 254 nm
[83]	Citalopram und Metabolite	ADS RP-4, RP-8 und RP-18	FLD, Exc. 235 nm, Em. 290 nm
[84]	Lonazolac und Metabolite aus Zellkulturmedien	Biotrap 500 MS	FLD, Exc. 273 nm, Em. 385 nm, bzw. LC-MS-MS

Die Vorsäulen sind gefüllt mit einem porösen Kieselgel, das an seiner Außenseite beispielsweise im Fall der verbreiteten ADS-Phase der Fa. Merck elektroneutrale Alkyldiolgruppen trägt; das Innere der Poren enthält gebundene C₁₈-, C₈- oder C₄-Phasen. In der Probenmatrix enthaltene Proteine werden aufgrund des Porenradius ausgeschlossen (Cutoff bei ca. 15 kD) und erfahren

durch die Alkyldiolschicht nur eine minimale Attraktion, so dass sie nicht zurückgehalten werden. Die enthaltenen Analyte dagegen können in die Poren eindringen und werden dort an der RP-Phase retiniert. Mit Hilfe dieser Materialien ist es möglich, Proben mit proteinreicher Matrix, z. B. Blut, direkt in die HPLC-Anlage zu injizieren. Durch die Säulenschaltung können auch größere Probenmengen zunächst auf der Vorsäule angereichert werden. Die Vorteile liegen in der guten Automatisierbarkeit der Verfahren, in der effektiven Entfernung der Matrix und auch in den insgesamt gerechnet niedrigeren Kosten [67].

In Tab. 3 sind zwar in der Regel nur Einzelbestimmungen aufgeführt, allerdings wurde ein vergleichsweise breites Spektrum von Substanzen abgedeckt. Eine Promotionsarbeit zum Thema der Probenvorbereitung für die STA mittels Restricted-Access-Materialien befindet sich derzeit am Institut für Rechtsmedizin der HU Berlin in Arbeit. Weitere Arbeiten zum Thema RAM finden sich in [85-88].

2.1.5 Literatur zu analytischen Messverfahren in der STA

Im Drei-Phasen-Modell der STA (vgl. Abschnitt 2.1.1) besteht der zweite Schritt in der Auftrennung und Detektion der in einer Probe vorliegenden Analyte. Hierzu wurden in der Vergangenheit zahlreiche Arbeiten publiziert, die, chronologisch gelesen, ein Spiegelbild der zum jeweiligen Zeitpunkt verfügbaren Analysentechniken abgeben und besonders den enormen technischen Fortschritt in der Instrumentellen Analytik in den vergangenen drei Jahrzehnten widerspiegeln.

So standen vor der Einführung von HPLC und GC als Standardverfahren vor allem dünnstschichtchromatographische Methoden im Mittelpunkt [89-94]. Diese können selbst heutzutage noch wertvolle ergänzende Hinweise liefern, allgemein wird die Substanzidentifizierung über R_f -Werte und entsprechende Farbreaktionen jedoch als nicht selektiv genug angesehen. Es gibt allerdings vereinzelte Veröffentlichungen über die Kopplung mit leistungsfähigeren Detektoren wie der Remissionsspektrometrie [93] oder über eine Glasfaseroptik mit einem Diodenarraydetektor [95]; im ersteren Fall bleibt allerdings die Qualität der gemessenen Spektren, in letzterem die Nachweisstärke hinter den mittels HPLC-DAD erzielbaren Ergebnissen zurück.

Seit Ende der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts haben sich stattdessen vor allem die sog. "Bindestrichtechniken" (hyphenated techniques) etabliert, die eine leistungsfähige Chromatographie mit hochselektiven Detektoren verbinden, allen voran GC-MS [45,63,64,96,97] und HPLC-DAD [22,25,26,92,98-103].

Eine besondere Spielart der HPLC mit UV-Detektion stellt das sog. Remedi-System der Firma Bio Rad dar. Durch die integrierte Online-Aufreinigung (Remedi HS) müssen die eingesetzten Proben vor der Injektion lediglich zentrifugiert werden. Ein aus mehreren Trennsäulen bestehendes chromatographisches System sorgt für eine effektive Trennung. Hierdurch wurde ein hoher Automatisierungsgrad erzielt, der demjenigen der in der klinischen Chemie üblichen Autoanalyzer sehr nahe kommt. Dies ist jedoch auch kritisch zu sehen: Maurer [5] verweist auf den begrenzten Nutzen der Automation in der toxikologisch-chemischen Analytik und bezeichnet die unkritische Übernahme automatisch erstellter Analysenergebnisse als fahrlässig. Einen

weiteren (und vielleicht noch größeren) Schwachpunkt des Remedi-Systems stellt der verwendete Scanning-Wavelength-UV-Detektor dar, der lediglich alle 100 ms 100 Wellenlängen abtasten kann. Die Qualität der erzielten UV-Spektren ist mit derjenigen zeitgemäßer Diodenarray-detektoren nicht zu vergleichen. Anwendungsbeispiele für das Remedi finden sich in [104-106].

Zahlreiche Übersichtsartikel beschäftigen sich vergleichend mit den in der STA eingesetzten Analysenverfahren [62,65,107-109]. Dabei zeigt sich, dass sich GC-MS und HPLC-DAD insbesondere in Bezug auf den abgedeckten Substanzkreis eher ergänzen, als dass sie miteinander konkurrieren [65]. Andererseits sind Zeit- und Kostenaufwand zu groß, um für jede Probe mit beiden Verfahren eine ungerichtete Suchanalyse durchzuführen, so dass i. d. R. die Entscheidung für eine der beiden Methoden fallen muss. Für die Auswahl der HPLC-DAD waren in der Abteilung Toxikologische Chemie des Instituts für Rechtsmedizin der HU Berlin mehrere Überlegungen ausschlaggebend:

Zunächst können für die HPLC einfache, zeitsparende und substanzschonende Probenaufbereitungsverfahren wie die Flüssig-Flüssig-Extraktion eingesetzt werden; für viele Analyte ist sogar die direkte Injektion der zentrifugierten Probe nach vorheriger Fällung des enthaltenen Eiweißes möglich. Die HPLC-DAD hat sich auch in Bezug auf die Anfälligkeit der verwendeten Geräte für Störungen als äußerst robust herausgestellt. Die Details des Verfahrens finden sich in Abschnitt 3.1.

Die Vorteile einer GC-MS-Methode liegen dagegen sicherlich in der leistungsfähigeren chromatographischen Trennung und den allgemein niedrigeren Nachweisgrenzen, u. a. aufgrund des geringeren benötigten Injektionsvolumens. Um diese zu erreichen, sind allerdings meist aufwändigere Festphasenextraktionen erforderlich. Hinzu kommt, dass die Gaschromatographie flüchtige, unzersetzt verdampfbare Analyte verlangt, so dass viele gerade der wichtigsten toxikologisch relevanten Medikamentwirkstoffe, bei denen es sich häufig um stark polare, basische Verbindungen handelt, gar nicht oder erst nach einer vorangegangenen Derivatisierung der Analyse zugänglich sind.

Die GC-MS ist - auch aufgrund der Einsatzmöglichkeit deuterierter innerer Standards - auf jeden Fall Methode der Wahl für die Bestimmung illegaler Drogen [110], die bei den beobachteten Blutkonzentrationen z. T. die HPLC-DAD vor Probleme stellen. Andererseits werden diese bereits durch das Screening mittels Immunoassay, bei dem eher das Problem falsch positiver (Kreuzreaktivitäten) als falsch negativer Befunde besteht, sicher qualitativ erfasst und können anschließend mittels GC-MS gezielt bestätigt werden.

In den letzten Jahren hat auch die LC-MS immer stärker an Bedeutung für die toxikologische Analytik gewonnen [109,111]. Ein Hauptproblem stellt bei den hierbei zum Einsatz gelangenden Ionisierungsverfahren die Reproduzierbarkeit der MS-Spektrenbibliotheken dar [56,112,113]. Weinmann et al. [51] untersuchten apparative Einflussgrößen auf ESI/CID-Massenspektren. Rittner et al. [58] fanden für dieselbe Ionisationstechnik hinsichtlich der Wiederfindung Schwankungen um bis zu 52 % relativ zum internen Standard als Folge u. a. der Abhängigkeit der Ionisierung von leichten Veränderungen der Flussrate. Müller et al. [114] beschreiben die teilweise Unterdrückung der Ionisation (Ionensuppression) bei der LC-ESI-MS durch gleichzeitig eluierende Matrixinterferenzen.

Über den Einsatz von Tandem-MS-Techniken für die STA wurde ebenfalls berichtet [50,115,116]. Aufgrund der Vielzahl möglicher Tochterionen wäre die Erstellung einer Spektrenbibliothek hier extrem aufwendig, die Probleme im Interlaborvergleich sicher noch größer. Zudem sprengen die immensen Anschaffungskosten und der erforderliche hohe personelle Aufwand derzeit den Rahmen der meisten forensisch-toxikologischen Labore.

Als wahrscheinlich wichtigste Technik der näheren Zukunft ist wohl die Online-Kopplung von HPLC mit DAD und MS-Detektor zu sehen [109]. Hierbei werden die Vorteile der Analyse aus flüssiger Phase mit einem Höchstmaß an Selektivität kombiniert. Würde der MS-Anteil vorwiegend als Bestätigungsanalyse der DAD-Messung betrachtet, träte die Problematik der MS-Spektrenbibliotheken in den Hintergrund.

Boone et al. [33,117-119] setzten auch verschiedene Spielarten der Kapillarelektrophorese (CZE, MEKC) für die STA ein. Diese Verfahren sind den bisher vorgestellten Verfahren derzeit hinsichtlich der erzielbaren Nachweisgrenzen noch unterlegen.

2.1.6 Literatur zu Spektrenbibliotheken

In der dritten Phase einer STA (s. Abschnitt 2.1.1) stellt die Bereitstellung toxikologisch relevanter Referenzdaten in entsprechenden Datenbanken eine wichtige Voraussetzung für die schnelle Durchführbarkeit dar. Im Notfall ist die Zeit für eine ausführliche Strukturaufklärung *de novo* nicht vorhanden. Die Entwicklung laborübergreifend verwendbarer Spektrenbibliotheken bedeutet auch einen wichtigen Schritt zur Qualitätsverbesserung in der forensischen Toxikologie: auf diese Weise können auch Laboratorien auf die gesammelten Referenzdaten zurückgreifen, die selbst nicht in der Lage sind, den entsprechenden Arbeitsaufwand für ihre Erstellung zu betreiben oder die keinen Zugang zu den entsprechenden Referenzsubstanzen haben.

Die Arbeit mit diesen Datenbanken ist in der Regel nur rechnergestützt möglich und konnte daher erst mit der in den letzten Jahren auch einem breiteren Anwenderkreis zur Verfügung gestellten Rechenleistung weite Verbreitung finden. Allerdings berichteten Gill et al. [89] bereits 1985 über eine Datenbank mit insgesamt 1.600 Datensätzen von R_f -Werten (acht verschiedene TLC-Systeme), gaschromatographischen Retentionsindizes (RI) und UV-Maxima in fünf verschiedenen Medien. Der experimentelle Aufwand, um alle genannten Messgrößen einer Probe zu erfassen, dürfte allerdings in der Praxis nicht erbringbar sein. Brady [120] berichtete 1993 über eine Datenbank bestehend aus GC-RI-Wert, einem TLC- R_f -Wert, zwei UV-Maxima und einigen MS-Peaks. Die Zahl der enthaltenen Verbindungen wird nicht angegeben, scheint aber in der Größenordnung einiger hundert Substanzen gelegen zu haben.

Datenbanken für die HPLC-DAD wurden - in chronologischer Reihenfolge - von folgenden Autoren vorgestellt: Turcant et al. ([98] (1991), 350 Substanzen, Wellenlängenbereich 210 - 400 nm), Baliková ([121] (1993), 180 Substanzen, enthält Retentionszeiten aus 8 verschiedenen isokratischen Trennsystemen), Bogusz und Erkens ([122] (1994), 363 Substanzen, enthält standardisierte Retentionsindizes), Tracqui et al. ([24] (1995), 311 Substanzen) und Gaillard und Pépin ([123] (1997), 600 Einträge). Es handelt sich um Bibliotheken für den Eigengebrauch.

Im Bereich der STA mit GC-MS stellt die Bibliothek von Pflieger, Maurer und Weber [32] den Standard dar. Sie enthält Massenspektren von über 6.300 Verbindungen, darin eingerechnet ist allerdings eine Vielzahl mit aufgenommener Derivatisierungsprodukte, so dass tatsächlich insgesamt deutlich weniger Wirkstoffe abgedeckt wurden. In jüngster Zeit wurden auch Spektrenbibliotheken für die LC-ESI/CID-MS von Weinmann et al. ([52] (2000), ca. 500 Einträge) und Marquet et al. ([124] (2001), ca. 1.600 Substanzen) vorgestellt.

2.1.7 HPLC

Auf das Prinzip der HPLC soll hier nicht näher eingegangen werden. Die wesentlichen Grundlagen werden ausführlich in [125] oder [126] dargelegt. Die wichtigsten Vorstellungen über Modelle zur Erklärung der Retention organischer Moleküle in der Umkehrphasenchromatographie werden z. B. in [127] beschrieben. Eine Literaturübersicht zu Struktur-Retentions-Beziehungen an RP-Säulen findet sich beispielsweise in [128].

2.1.8 UV-Spektroskopie an organischen Molekülen

Die Grundlagen der UV-Spektroskopie sollen hier nur in Stichworten dargestellt werden, die Details finden sich in einschlägigen Lehrbüchern, z. B. in [129-131].

Im hier relevanten Spektralbereich des nahen UV (200 - 400 nm, im Rahmen der Spektrenbibliothek wurden Spektren von 195 - 380 nm aufgenommen) werden vor allem elektronische $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ und, seltener, $n \rightarrow \sigma^*$ -Übergänge angeregt. Für all diese Übergänge gelten Voraussetzungen und Auswahlregeln (Übergangsdipolmoment, Spinverbot, Symmetrieverbot), aus denen sich unterschiedliche Übergangswahrscheinlichkeiten ("erlaubte" bzw. "verbotene" Übergänge) und in der Folge unterschiedliche Intensitäten ergeben. Als Maß für die Wahrscheinlichkeit / Intensität eines Übergangs wird die sog. Oszillatorstärke f angegeben, die dem Quadrat des Übergangsdipolmomentes proportional ist.

Bestrahlt man in einer geeigneten Messzelle (bei der HPLC-DAD die von der mobilen Phase durchströmte Durchflusszelle) der Dicke d eine Lösung der Konzentration c eines UV-absorbierenden Stoffes mit Licht der Wellenlänge λ , so gilt das bekannte Gesetz von Bouguer, Lambert und Beer:

$$E_{\lambda} = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon_{\lambda} \times c \times d = \epsilon_{\lambda} \times n \times V \times d \quad (1)$$

mit E_{λ} = Extinktion bei der Wellenlänge λ , I_0 = Intensität des in die Messzelle einfallenden und I des aus ihr austretenden Lichtstrahls, n = Stoffmenge des Analyten in der Messzelle, V = Volumen der Messzelle und ϵ_{λ} = stoffspezifischer molarer Extinktionskoeffizient.

Bedingt durch verschiedene physikalische Prozesse (Kopplung mit Rotations- und Schwingungsübergängen, Doppler- bzw. Lebensdauererweiterung) resultieren keine Linien- sondern Bandenspektren, so dass als Maß für die Intensität eines Überganges das Integral über alle ϵ_{λ} ("integraler Absorptionskoeffizient" A , auch hier besteht Proportionalität zwischen der Oszil-

latorstärke und dem Quadrat von A) der betreffenden Bande gebildet werden muss. In der Praxis wird für einen groben Vergleich zweier Übergänge jedoch der Einfachheit halber meist der molare Extinktionskoeffizient im Bandenmaximum $\epsilon_{\lambda, \max}$ verwendet.

Der Dimension nach (meist: $\text{cm}^2 \times \text{mmol}^{-1}$) handelt es sich bei ϵ_{λ} um den molaren Absorptionsquerschnitt des jeweiligen Stoffes für Licht der betreffenden Wellenlänge. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass zur UV-Absorption organischer Moleküle häufig nur ein Teil der Molekülstruktur beiträgt, der allgemein als "Chromophor" bezeichnet wird.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Typen von im nahen UV möglichen Übergängen soll in der vorliegenden Arbeit als Chromophor im engeren Sinne eine Struktur verstanden werden, in der ein konjugiertes π -Elektronensystem aus mindestens zwei Mehrfachbindungen vorliegt, das durch Heteroatome mit freien Elektronenpaaren verlängert sein kann. Gleichwohl gibt es auch Verbindungen, die im betrachteten Wellenlängenbereich Absorption zeigen, ohne diese Definition zu erfüllen. In der Arbeit mit der Spektrenbibliothek hat sich folgende Bezeichnungsweise für die Chromophore eingebürgert: die entsprechende Teilstruktur wird in den Seitenketten jeweils bis zum ersten sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatom verfolgt. Dort wird der Rest des Moleküls "abgeschnitten" und durch Wasserstoffatome ersetzt. Der Chromophor erhält dann den IUPAC-Namen des resultierenden Moleküls. Ein Beispiel zeigt Abb. 2.

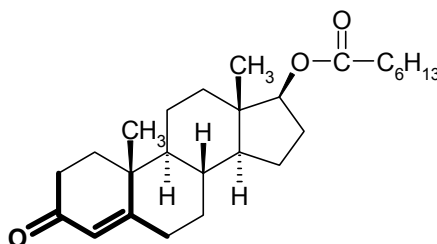


Abb. 2: Ermittlung/Benennung des Chromophors; Substanz: Testosteronenantat, Chromophor (hervorgehoben): 4-Methylpent-3-en-2-on.

Liegen in einem Molekül mehrere Chromophore in ausreichendem Abstand isoliert voneinander vor, so setzt sich die Gesamtextinktion näherungsweise additiv aus den Extinktionen der einzelnen Chromophore zusammen. Da insgesamt jedoch ein neues UV-Spektrum entsteht, soll in der vorliegenden Arbeit sowohl im Falle einzelner Chromophore als auch bei Kombinationen verschiedener isolierter Chromophore der Begriff "Absorptionssystem" verwendet werden. Ein Beispiel hierfür zeigt Abb. 3.

Die Beziehungen zwischen chemischer Struktur und UV-Absorption sind außerordentlich komplex, Einführungen geben z. B. [129,132,133]. Qualitativ betrachtet wird eine Substanz umso intensiver und langwelliger absorbieren, je ausgedehnter ihr Absorptionssystem (größerer Absorptionsquerschnitt bei gleichzeitiger Absenkung des HOMO-LUMO-Abstandes durch Delokalisation) und je größer die Elektronendichte im Absorptionssystem ist (größere Abschirmung der Kernladungen führt zu erhöhter Beweglichkeit der Elektronen und zu größeren Übergangsdipolmomenten).

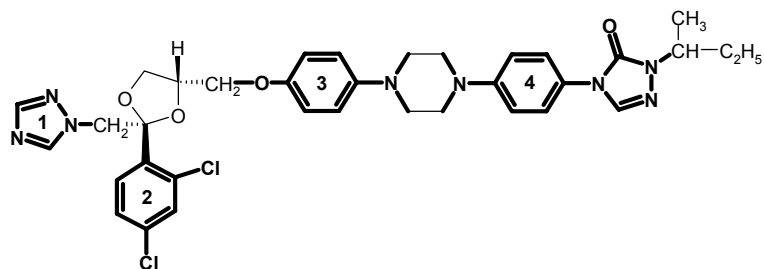


Abb. 3: Vorkommen mehrerer voneinander isolierter Chromophore in einem Molekül; Substanz: Itraconazol, Chromophor 1: 1-Methyl-1,2,4-triazol, Chromophor 2: 2,4-Dichlortoluol, Chromophor 3: N,N-Dimethyl-4-methoxyanilin, Chromophor 4: N,N-Dimethyl-4-[1-methyl-5-oxo-(4H)-1,2,4-triazol-4-yl]anilin. Die Kombination der vier Chromophore wird als neues Absorptionssystem aufgefasst.

Ohne die (oft nicht vorhandene) genaue Kenntnis der exakten dreidimensionalen Molekülstruktur unter den Messbedingungen ist jedoch Vorsicht geboten: so können Intensität und λ_{\max} z. B. bei größeren konjugierten Systemen durch Störung der Koplanarität aus sterischen Gründen stark vermindert bzw. verschoben werden. Wechselwirkungen über den Raum hinweg (Charge Transfer, intramolekulare Wasserstoffbrücken u. ä.) werden in der bloß zweidimensionalen Strukturformel leicht übersehen. Je nach Starrheit des Molekülgerüsts können Schwingungsfeinstrukturen durch Torsionsschwingungen nivelliert werden. Bei der HPLC-DAD wird die tatsächliche räumliche Struktur des Moleküls darüber hinaus noch durch die umgebende mobile Phase auf schwer vorhersagbare Weise zusätzlich beeinflusst.

Um exakte Struktur-Absorptions-Beziehungen beschreiben zu können, müssten die Wellenfunktionen des Grund- und des angeregten Molekülzustandes berechenbar sein; hierfür stehen auch heutzutage nur Näherungsverfahren zur Verfügung, die Berechnung für einige Tausend Wirkstoffe würde jeden Rahmen sprengen. In Lehrbüchern zur UV-Spektroskopie (s. o.) finden sich Inkrementmethoden, mit denen UV-Maxima für einfache Chromophoren-Grundkörper, ergänzt durch nicht UV-aktive Substituenten (sog. Auxo- bzw. Antiauxochrome) abgeschätzt werden können, diese sind aber zur Vorhersage kompletter Spektren nicht geeignet. Es zeigte sich überdies (auch in der vorliegenden Arbeit, vgl. Abschnitt 4.6.3 ff.), dass oftmals auch der nicht zum Chromophor gehörende Molekülrest einen erheblichen Einfluss auf das UV-Spektrum ausübt.

Die Tatsache, dass die UV-Absorption eines Moleküls oftmals nur auf eine Teilstruktur zurückzuführen ist, stellt gegenüber der Massenspektroskopie zunächst einen Nachteil dar: anders als bei dieser ist es nicht möglich, nur durch das UV-Spektrum eine Molekülstruktur komplett aufzuklären. Im Rahmen der Bioanalytik ergibt sich andersherum aber ein großer Vorteil: in den Organismus aufgenommene Wirkstoffe durchlaufen vor ihrer Ausscheidung z. T. zahlreiche Metabolisierungsschritte, bei denen es zum Um- oder Abbau funktioneller Gruppen, zur Molekülsplaltung und zur Konjugation mit körpereigenen organischen Säuren kommen kann (s. Lehrbücher der Pharmakologie und Toxikologie, z. B. [134]). Wird im Zuge der Metabolisierung das Absorptionssystem einer Substanz nicht verändert (und dies ist nicht selten der Fall, da Metabolisierungsreaktionen oftmals an Seitenketten angreifen), so zeigen auch die resultierenden Metabolite das Spektrum der Ausgangssubstanz bei allerdings veränderter Retentionszeit. Herre und Pragst [128] berichteten, dass mit bestimmten Metabolisierungsreaktionen charakteristische Retentionszeitverschiebungen einhergehen.

Für die Durchführung einer ungerichteten Suchanalyse mittels HPLC-DAD ist dies von großer praktischer Bedeutung: Metabolite können zur Vergiftungsaufklärung beitragen, auch wenn die eigentliche Muttersubstanz im Blut bereits nicht mehr nachweisbar ist, auf ihre Struktur kann bei bekanntem Metabolisierungsschema u. U. aus der Retentionszeitverschiebung geschlossen werden, und Substanzidentifikationen werden durch den gleichzeitigen Nachweis der Metabolite zusätzlich abgesichert.

Gegenüber der komplizierten qualitativen Seite der UV-Spektroskopie liegen die quantitativen Aspekte vergleichsweise einfach. Nach Gl. (1) ist die Extinktion für eine gegebene Substanz und eine gegebene Wellenlänge bei konstanten Abmessungen der Messzelle proportional zur in der Messzelle befindlichen Stoffmenge n des Analyten. Im Falle der HPLC-DAD ist das zeitliche Integral über die aufgezeichnete Extinktion eines Analyten, die Peakfläche im Chromatogramm, proportional zur gesamten injizierten Stoffmenge des Analyten bzw., nach Bezug auf das Injektionsvolumen, zur Konzentration des Analyten in der Probe. Es ist allerdings zu beachten, dass durch die Integration über die Zeit die Peakfläche auch direkt von der gewählten Flussrate abhängt. Des weiteren ist dieser Zusammenhang nur für verdünnte Lösungen linear: neben der Zunahme der Streuung und neben den durch das Messgerät gesetzten Grenzen (Überladung) wird die Extinktion bei höheren Konzentrationen auch durch den veränderten Brechungsindex beeinflusst.

2.1.9 Der Diodenarraydetektor

Mit der Markteinführung des ersten Diodenarraydetektors für die HPLC vor genau 20 Jahren (HP 1040a) war es erstmals möglich, kontinuierlich und simultan komplette UV-Spektren mit einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit zu messen, mit der auch schmale HPLC-Peaks hinreichend gut zeitlich aufgelöst werden konnten. Das Kernstück eines solchen Detektors stellt das sog. Photodiodenarray dar. Photodioden bestehen aus zwei miteinander verbundenen Halbleiterschichten aus dotiertem Silizium (p- und n-Phase, zu Halbleitern s. Lehrbücher der Physik, z. B. [135], zum Diodenarraydetektor s. [136] und [131], S. 114). An diese wird beim DAD über einen Kondensator eine äußere Spannung angelegt. Trifft ein Photon geeigneter Energie auf die Übergangsschicht zwischen p- und n-Schicht, fließt ein sog. Umkehrstrom, der den Kondensator teilweise oder ganz entlädt. Der Strom, der anschließend zum erneuten Aufladen des Kondensators benötigt wird, wird über einen Transistor verstärkt und stellt das eigentliche Messsignal dar. Er ist proportional zur Zahl einfallender Photonen und damit zur Intensität des einfallenden Lichtes. In Abb. 4 ist der Strahlengang in einem Diodenarraydetektor wiedergegeben.

Aus der verwendeten Lichtquelle (Deuteriumlampe, z. T. ergänzt durch eine Wolframlampe) trifft das Licht polychromatisch auf die HPLC-Durchflusszelle (Umkehroptik). Im Strahlengang vorgeschaltet befindet sich eine Schließblende (Shutter), die das Licht entweder ungehindert passieren lässt (Messung), den Strahlengang verschließt (Messung des Dunkelstroms) oder einen Holmium-Filter in diesen einbringt (Wellenlängenkalibrierung). Das aus der Messzelle austretende Licht wird auf ein holographisches Gitter fokussiert, durch dieses in die einzelnen Wellenlängen zerlegt und auf das Photodiodenarray abgebildet. Je nach Anzahl der Photodioden und der Güte der optischen Bauelemente wird so eine Auflösung von $< 1 \text{ nm} / \text{Diode}$ erreicht.

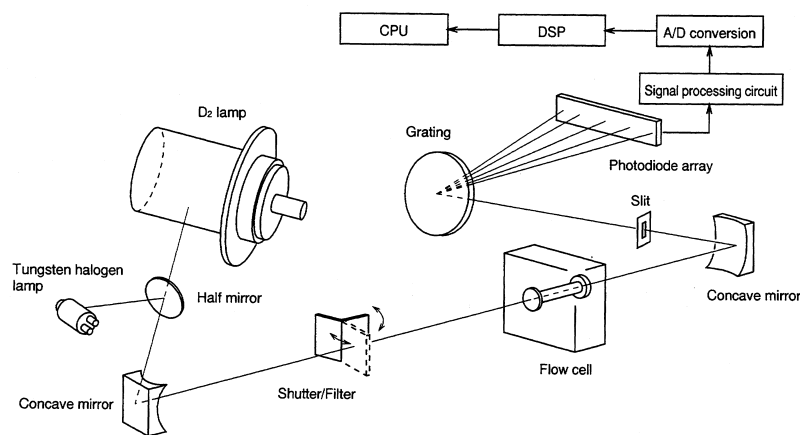


Abb. 4: Strahlengang im Diodenarraydetektor (aus [137]). Erläuterung im Text.

Das zunächst analoge Messsignal wird kanalweise digitalisiert und der weiteren Signalbearbeitung (Rechner) zugeführt. Die Korrektur gegen die Eigenabsorption der mobilen Phase erfolgt jeweils zu Beginn einer Messung: sämtliche mit den Photodioden verschalteten Kondensatoren werden entladen, außerdem wird der Dunkelstrom (als Nullwert bei in den Strahlengang eingeführter Schwarzblende) gemessen, das zu diesem Zeitpunkt auf die Photodioden fallende Licht wird für jeden Kanal als 100-%-Durchlässigkeitswert (I_0 , vgl. Gl.(1)) zur späteren Berechnung der Extinktion gespeichert. Des weiteren wird die aktuelle Lampenintensität ständig durch eine separate Photozelle gemessen und ebenfalls in die Korrektur einbezogen. Die technischen Kenndaten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Diodenarraydetektoren finden sich in Abschnitt 3.3.3.

2.2 Analytisch-chemische Identifizierung mittels HPLC-DAD

2.2.1 Ergebnisraum, Dimensionalität, Identifizierung

Um einige der folgenden Ausführungen besser verstehen zu können, ist es erforderlich, den Prozess der chemischen Analyse zunächst weitestgehend zu abstrahieren: Eine unbekannte Anzahl von Substanzen mit mehr oder weniger unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften soll in einer Analysenprobe vollständig gemischt vorliegen und daher (vor einer chemischen Analyse) zunächst ununterscheidbar sein.

Wird nun eine solche physikochemische Eigenschaft (Messgröße, Variable) durch einen analytisch-chemischen Prozess abgefragt, so zeigen die einzelnen Probenbestandteile eine unterschiedlich stark ausgeprägte Fähigkeit zur Antwort (Response).

Eine derartige Bestimmung von m Messgrößen (m -dimensionales Analysenverfahren) erzeugt einen m -dimensionalen sog. Ergebnisraum, in dem die m Variablen x_1, x_2, \dots, x_m ein Koordinatensystem aufspannen. Dieses ist orthogonal, sofern die Variablen voneinander linear unabhängig sind, d. h. wenn es unmöglich ist, eine Variable durch eine Linearkombination der anderen darzustellen (im Falle von UV-Spektren, die ja Bandenspektren sind, ist dies jedoch nicht gegeben). Der Ergebnisraum repräsentiert in seiner Gesamtheit die Summe aller möglichen

Messergebnisse, die sog. analytischen Zustände (vgl. Abschnitt 2.4.1).

Im Ergebnisraum wird jedes Messsignal durch einen Punkt repräsentiert. Dieser Punkt kann mathematisch entweder durch die Angabe der entsprechenden Koordinaten als m -Tupel, oder aber durch einen m -dimensionalen Vektor ausgedrückt werden. Während die Richtung dieses Vektors die Gestalt des Messsignals bestimmt, spiegelt sein Betrag die Signalintensität wider.

Insgesamt resultiert eine (im Falle der Chromatographie sogar echte physikalische, ansonsten virtuelle) Auftrennung der Probenkomponenten entlang der Koordinaten der betrachteten Messgrößen. Diese ist um so ausgeprägter, je größer der Abstand ist, den die Messsignale zueinander im Ergebnisraum einnehmen. Umgekehrt lassen sich Komponenten, deren Messsignale in einer Dimension des Ergebnisraums zusammenfallen, durch die betreffende Messgröße nicht trennen. Diese Einsicht hat zur Entwicklung möglichst hochdimensionaler Analysenverfahren geführt.

Ein reales analytisch-chemisches Experiment ist allerdings immer mit Messfehlern behaftet. Als Resultat hieraus wird ein Messsignal im Raum nicht mehr durch einen Punkt, sondern vielmehr durch ein durch die Fehlergrenzen in allen m Dimensionen definiertes Volumenelement repräsentiert, dessen Größe mit der vom Experiment im Einzelfall verlangten Aussagesicherheit variiert. I. d. R. wird dabei für die statistische Verteilung innerhalb eines bestimmten Volumenelementes bei Wiederholungsmessungen in jeder Dimension Normalverteilung angenommen. In diesem Modell lassen sich Komponenten, deren Volumenelemente sich im Ergebnisraum überschneiden, durch das Analysenverfahren nicht mehr sicher unterscheiden. Es soll nun auf die Praxis der STA mittels HPLC-DAD übertragen werden:

Durch die Messung der Spektrenbibliothek liegen die Messwerte der in ihr enthaltenen Substanzen als Referenz vor. Eine Identifizierung gilt dann als erreicht, wenn sich das Volumenelement des gemessenen Objektes und dasjenige der entsprechenden Referenz über ein vorher zu definierendes Mindestmaß (Vertrauensintervall) hinaus überlappen. Kommen mehrere Referenzkomponenten in Frage, ist eine eindeutige Identifizierung zunächst unmöglich.

2.2.2 HPLC: Substanzidentifizierung über die Retentionszeit

In einem gegebenen HPLC-Trennsystem kann die absolute Retentionszeit als charakteristische Eigenschaft des Analyten zu seiner Identifizierung verwendet werden. Während die Retentionszeit der einzelnen Moleküle durch Prozesse wie Eddy-Diffusion, Längsdiffusion und Stoffaustauschverzögerung streut ([125], S. 30 ff.), was zur typischen, im Idealfall gaußschen Peakform führt, kommt es auch in Bezug auf die Retentionszeit des Analyten insgesamt (Lage des Peakmaximums) zu Abweichungen, die im wesentlichen auf apparative Parameter (Schwankungen der Flussrate oder sogar Umbau der Anlage mit Veränderung der Totzeit) oder auf Veränderungen von mobiler (Zusammensetzung) bzw. stationärer Phase (Belegung der Säule mit nicht eluierbaren Analyten oder Matrixkomponenten) zurückzuführen sind. Die Mehrzahl dieser Prozesse führt zu systematischen, also alle Substanzen gleichermaßen betreffenden Verschiebungen der absoluten Retentionszeit. Dabei sind aufgrund des längeren Aufenthaltes im System später eluierende Verbindungen stärker betroffen als früher eluierende. Veränderungen in der Zusammensetzung oder im pH-Wert des Eluenten betreffen die Analyten dagegen in Abhängigkeit von

ihrer Struktur unterschiedlich stark.

Soll eine HPLC-DAD-Methode in verschiedenen Laboratorien zum Einsatz kommen, oder wird der Eluent wie in der vorliegenden Arbeit im Kreislauf gefahren (vgl. Abschnitt 3.1), ist es zum Ausgleich zumindest der systematischen Schwankungen empfehlenswert, die RT-Werte auf diejenigen geeigneter Referenzsubstanzen zu beziehen. In der vorliegenden Arbeit wurde die um die Totzeit korrigierte sog. relative Retentionszeit (RRT) verwendet, die als zusätzlicher Identifikationsparameter in die Spektrenbibliothek aufgenommen wurde:

$$RRT_{i,s} = \frac{RT_i - T_0}{RT_s - T_0} \quad (2)$$

mit $RRT_{i,s}$ = relative Retentionszeit der Substanz i, bezogen auf den Standard s, RT_i = absolute Retentionszeit von i, RT_s = absolute Retentionszeit des Standards s und T_0 = Totzeit (s. Abb. 5).

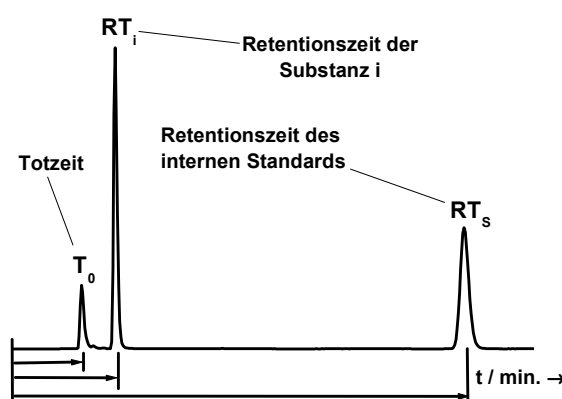


Abb. 5: Chromatogramm mit Parametern zur Berechnung der RRT.

Bogusz und Erkens [122] haben für denselben Zweck in Analogie zu den aus der GC bekannten Kováts-Indizes für die von ihnen verwendete Gradientenelution eine weitergehende Standardisierung auf der Basis von Retentionsindizes (RI) empfohlen. Als Bezugspunkt wurde zunächst die homologe Reihe der 1-Nitroalkane vorgeschlagen, es zeigte sich jedoch, dass schon geringe Veränderungen am Trennsystem zu Schwankungen der RI-Werte führten. In der Folge wurden dann die Retentionszeiten auf ein Gemisch weitverbreiteter Drogen- und Medikamentwirkstoffe bezogen [138]. Dem nicht allzu großen Gewinn an Reproduzierbarkeit, verglichen mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten RRT, steht dabei jedoch der erhöhte Messaufwand gegenüber.

Auch die RRT ist noch mit einem statistischen Fehler behaftet, so dass eine tatsächlich gemessene RRT von einem für diese Substanz ursprünglich gemessenen Referenzwert in einem gewissen Ausmaß abweichen kann. Bei der Substanzidentifizierung, also dem Vergleich des/der Messwerte(s) einer zunächst unbekannten Substanz mit den in einer Datenbank gespeicherten Referenzwerten aller in Frage kommender Substanzen, stellt sich daher die Frage, bis zu welcher RRT-Differenz vom Referenzwert eine Verbindung noch als identifiziert gelten kann.

Nimmt man dabei den Fehler des letzteren als im Verhältnis vernachlässigbar klein an, dann hängt der zu berücksichtigende RRT-Bereich nur von der zu erwartenden Streuung des Messwertes ab. Diese kann als um einen Erwartungswert herum normalverteilt angenommen werden, wobei ihr Ausmaß durch die Standardabweichung σ ausgedrückt wird (die im Falle einer Schätzung, z. B. auf der Grundlage von Wiederholungsmessungen, mit dem lateinischen

Buchstaben s bezeichnet wird). Im Gegensatz zur Gleichverteilung sinkt bei der Normalverteilung die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Messwertes mit zunehmendem Abstand vom Erwartungswert der Verteilung. Normiert man die Normalverteilung auf die Fläche Eins, zentriert sie auf den Mittelwert Null und führt dann für eine Substanz i den Lageparameter $z_i = |(x_i - \mu_i) / s_i|$ ein (auch als "Exzentrizität" bezeichnet, mit x_i = Mess-, μ_i = Referenz-/Erwartungswert und s_i = geschätzte Standardabweichung von μ_i), dann ergibt sich für das sog. Wahrscheinlichkeitsintegral die Formel:

$$\Phi_0 = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-z_i}^{+z_i} e^{-0,5z_i^2} dz \quad (3)$$

Hieraus kann die Wahrscheinlichkeit berechnet werden, mit der bei einer unendlichen Anzahl von Messungen ein Messwert im Bereich von $\mu_i \pm z_i$ gefunden würde. Die Werte von Φ_0 liegen in Abhängigkeit von z_i tabelliert vor [139], für $z_i = 1$ ($x_i = \mu_i \pm s_i$) ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von etwa 68,3 %, für $z_i = 2$ ($x_i = \mu_i \pm 2 s_i$) erhält man ca. 95,4 %.

Auf dieser Grundlage haben Akkerboom et al. [140] (für den Vergleich von R_F -Werten aus der Dünnschichtchromatographie) und Hartstra et al. [141] (allgemeines Konzept) folgenden Ansatz für die Substanzidentifizierung eingeführt: liegt der Messwert x_i einer unbekannten Substanz vor, so wird in Bezug auf alle Referenzwerte aus der Datenbank die Wahrscheinlichkeit für die Übereinstimmung von Mess- und Referenzwert berechnet (Rechenweg s. dort). Im Ergebnis erfolgt dann, unter der Voraussetzung, dass die "richtige" Substanz überhaupt in der Datenbank enthalten ist, die Wertung als identisch für diejenige Referenzsubstanz mit der höchsten berechneten Wahrscheinlichkeit. Dieses Konzept soll im folgenden als "Wahrscheinlichkeitsansatz" bezeichnet werden.

In einer einfacheren Betrachtung wird ein Schwellenwert z vorgegeben, bei dessen Überschreitung die gemessene Substanz nicht mehr als mit der Referenzsubstanz identisch gewertet wird. Dieses Konzept wird auch als "Fensteransatz" (window approach) bezeichnet, weil dabei diejenigen Datenbankeinträge für eine Identifizierung in Frage kommen, die innerhalb eines Fensters von $\mu_i \pm (z \times s_i)$ fallen. Ist die gesuchte Substanz tatsächlich in der Datenbank enthalten, und wählt man beispielsweise $z = 2$, so erfasst man mit diesem Fenster den Wert der richtigen Substanz mit einer Sicherheit von 95,4 %.

Auch bei der Identifizierung über den Wahrscheinlichkeitsansatz kommen nur Referenzsubstanzen mit einer vorgegebenen Mindestwahrscheinlichkeit in die engere Wahl, so dass hier de facto ebenfalls ein Fenster konstruiert wird. Hervorzuheben ist jedoch, dass der Fensteransatz alle Kandidaten innerhalb des Fensters als gleichwertig ansieht.

Demme et al. [142] diskutieren noch weitere Ansätze, darunter ein Übereinstimmungsmaß auf der Basis der chromatographischen Auflösung zwischen dem Peak der unbekannten Substanz und demjenigen der Referenz. Die Gründe, die in der vorliegenden Arbeit zu einer Entscheidung für den Fensteransatz geführt haben, werden in Abschnitt 4.5.3 diskutiert.

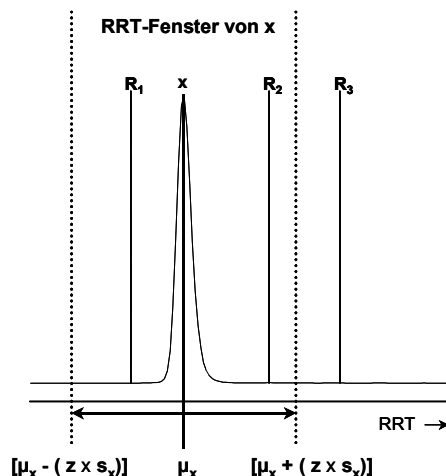


Abb. 6: "Fensteransatz": Modellchromatogramm des Messwertes x , mit eingetragen sind die zur Identifizierung herangezogenen Referenzwerte R_1 bis R_3 . R_1 und R_2 fallen in das RRT-Fenster von x und können somit von diesem nicht sicher unterschieden werden (Fensteransatz). R_3 liegt außerhalb des Fensters und ist von x unterscheidbar. Im Wahrscheinlichkeitsansatz (s. Text) würde x mit R_1 identifiziert, da dieses näher am Erwartungswert μ_x liegt und daher mit größerer Wahrscheinlichkeit mit x übereinstimmt als R_2 (vgl. [141]).

2.2.3 DAD: Substanzidentifizierung über das UV-Spektrum

Für die mathematische Erfassung der Ähnlichkeit zweier UV-Spektren wurde eine Reihe mathematischer Algorithmen vorgeschlagen, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll. Einzelheiten finden sich in [143-145].

Wie bereits weiter oben (Abschnitt 2.2.1) erläutert, kann ein Messergebnis im m -dimensionalen analytisch-chemischen Ergebnisraum als m -dimensionaler Vektor beschrieben werden. Dieser Vorgang ist in Abb. 7, vereinfacht für einen dreidimensionalen Ergebnisraum (Messung der Extinktion bei drei verschiedenen Wellenlängen), dargestellt. Er kann aber ganz analog auf den dann nicht mehr anschaulichen Fall eines kompletten UV-Spektrums, bestehend aus 181 Extinktionswerten im Wellenlängenbereich von 200 – 380 nm (181-dimensionaler Ergebnisraum), angewendet werden.

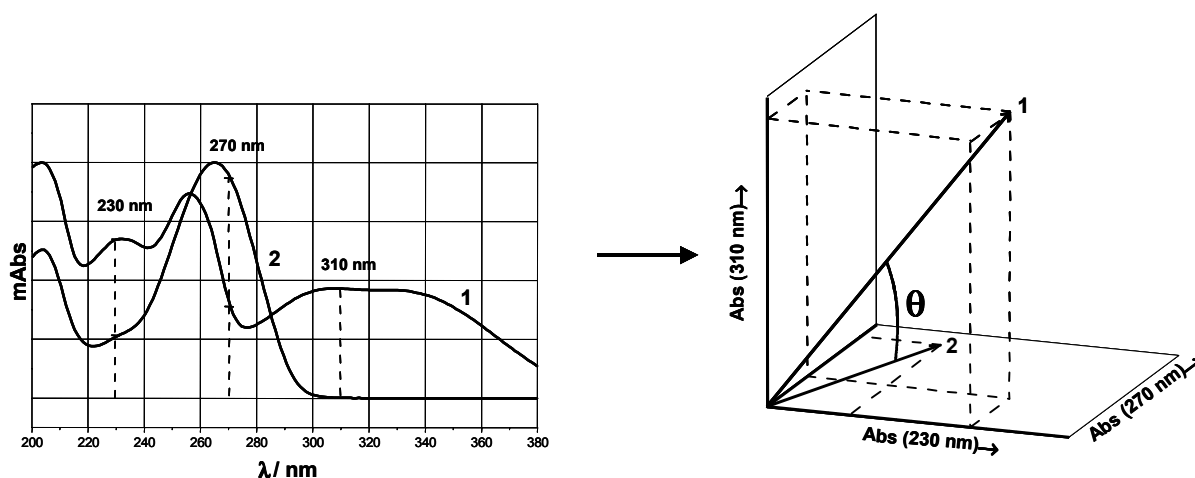


Abb. 7: Umwandlung von UV-Spektren in Vektoren. In diesem Beispiel werden "Spektren" aus drei Extinktions-Wellenlängen-Wertepaaren in den dreidimensionalen Vektorraum überführt. Analog erfolgt die (nicht mehr direkt anschauliche) Darstellung von UV-Spektren mit 181 Wertepaaren im 181-dimensionalen Vektorraum.

Als Maß der Ähnlichkeit zwischen Proben- und Referenzspektrum wurde in der vorliegenden Arbeit (durch die eingesetzte HPLC-Software vorgegeben) der Kosinus des Winkels zwischen den entsprechenden beiden Vektoren gewählt. Das Ergebnis wird auch als Similarity Index (SI) bezeichnet.

$$SI = \cos \theta_{\vec{s}_1, \vec{s}_2} = \frac{\vec{s}_1 \cdot \vec{s}_2}{|\vec{s}_1| \times |\vec{s}_2|} = \frac{\sum_{\lambda_i} [Abs_1(\lambda_i) \times Abs_2(\lambda_i)]}{\sqrt{\sum_{\lambda_i} Abs_1(\lambda_i)^2} \times \sqrt{\sum_{\lambda_i} Abs_2(\lambda_i)^2}} \quad (4)$$

mit \vec{s}_i = Vektor des Spektrums i und $Abs_j(\lambda_i)$ = Extinktion im Spektrum der Substanz j bei der Wellenlänge λ_i . Setzt man voraus, dass keine negativen Extinktionen möglich sind, läuft der SI theoretisch von Null (ganz und gar verschieden) bis Eins (identisch):

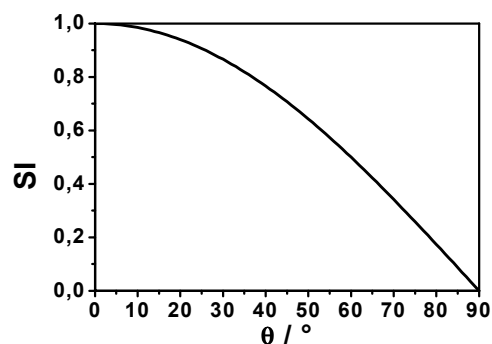


Abb. 8: Verlauf des Similarity Index SI in Abhängigkeit vom Winkel θ .

Man erkennt, dass es eines relativ großen Winkels (großer Unterschiedlichkeit der Spektren) bedarf, um den SI unter einen Wert von 0,9 zu senken. Dies hat umgekehrt zur Folge, dass sich feinere Spektrenunterschiede in der Regel im Bereich der dritten und vierten Nachkommastelle des SI ausdrücken. Werte des SI unterhalb von 0,8 sind in der Praxis auch bei im visuellen Vergleich völlig verschiedenen Spektren extrem selten. Die Spektren reiner Lösungen werden dagegen in der Regel mit einem SI von 1,0000 identifiziert, bei niedrigen Konzentrationen kann es zu einer leichten Verringerung kommen. In der Praxis bedeutet dies, dass auch Spektrenpaare mit einem $SI < 1,0000$ bis zu einem festzulegenden Schwellenwert als identisch gewertet werden müssen. Diese Frage wird im Abschnitt 4.5.4 ausführlich diskutiert.

Die Berechnung von SI-Werten muss sich nicht auf den gesamten gemessenen Wellenlängenbereich beziehen: insbesondere bei Verbindungen, die über einen Großteil des Messbereiches keine nennenswerte Extinktion zeigen, wird die Übereinstimmung durch Auswahl des wirklich relevanten Extinktionsbereiches oft deutlich verbessert.

2.2.4 Vorgehen in der Praxis: Kombination von RRT und Spektrum

Während im Falle einer realen Messung die Retentionszeit eines zu untersuchenden Peaks sofort zur Verfügung steht, sind zur Gewinnung eines verwertbaren UV-Spektrums die folgenden drei

Schritte durchzuführen (teilweise automatisch durch die Software):

- Die Grenzen des Peaks müssen korrekt gesetzt sein.
- Es muss geprüft werden, ob der beobachtete Peak nur auf ein Substanzsignal zurückzuführen ist, oder ob er sich aus den überlagerten Signalen mehrerer Verbindungen zusammensetzt (Peakreinheitsprüfung). Hierfür stehen i. d. R. innerhalb der HPLC-DAD-Software passende Algorithmen bereit (vgl. [145]). Eine einfache Möglichkeit besteht darin, das Verhältnis zwischen den Extinktionen auf zwei verschiedenen Wellenlängen über die gesamte Breite des Peaks zu verfolgen - für einen reinen Peak darf es sich nicht ändern.
- Es muss eine Untergrundkorrektur ("background correction") durchgeführt werden, d. h. das "Spektrum" zu Beginn und dasjenige an seinem Ende werden gemittelt und vom Spektrum im Peakmaximum subtrahiert. Ist ein Substanzsignal tatsächlich teilweise durch ein anderes überlagert, so kann das untergrundkorrigierte Spektrum – allerdings bei schlechterem Signal-Rausch-Verhältnis - auch abseits der Peakspitze aus dem nicht überlagerten Teil gewonnen werden.

Der Vergleich des Spektrums einer unbekannten Substanz mit den in der Spektrenbibliothek gespeicherten erfolgt anschließend direkt per Mausklick aus der HPLC-Software heraus. Als Ergebnis erhält man eine "Trefferliste", in der gefundene, ähnliche Referenzspektren in der Reihenfolge absteigender SI-Werte aufgeführt werden.

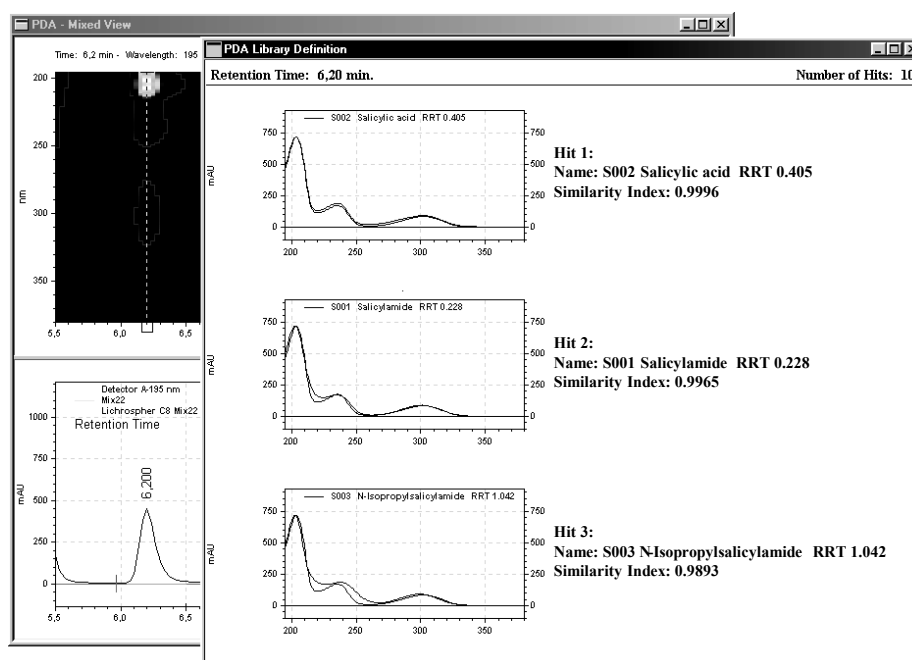


Abb. 9: Bildschirmansicht eines Suchergebnisses in der Spektrenbibliothek

Aus dieser Liste kommen nur diejenigen Einträge für eine Identifizierung in Frage, deren RRT in das Fenster der zu identifizierenden Substanz fällt (vgl. Abschnitt 2.2.2).

Bei alledem muss beachtet werden, dass die zu identifizierende Substanz nicht notwendigerweise in der Bibliothek vorhanden sein muss. Aus diesem Grund und auch, um eine etwaige

Verfälschung des Spektrums durch Rauschen, Matrixüberlagerungen etc. auszuschließen, wird neben der Überprüfung der RRT abschließend stets ein visueller Vergleich der Spektren am Bildschirm vorgenommen.

2.3 Validierung

2.3.1 Validierung in der forensischen Toxikologie

Auf die große Bedeutung des Themas Qualitätsmanagement für den Bereich der forensischen Toxikologie wurde bereits in der Einleitung hingewiesen. Die Umsetzung dieser Standards stößt z. T. noch auf erhebliche Widerstände, kleinere Labore sehen sich finanziell, personell und apparativ überfordert und fürchten um ihre Existenz. Auch wird ein zu starres und schematisches Vorgehen bei der Anwendung auf die teils sehr komplexen Fragestellungen der toxikologischen Analyse befürchtet.

Andererseits bietet die Einführung eines Qualitätsmanagements auch große Chancen. Rösener [146] nennt als größten Nutzen die Möglichkeit zur Dokumentation der auf die Lösung des Analysenproblems verwendeten Sorgfalt gegenüber Gerichten und anderen Auftraggebern und erinnert daran, dass der strafrechtliche Begriff der Fahrlässigkeit als Außerachtlassen eben dieser nötigen Sorgfalt definiert ist. Peters und Maurer [147] verweisen auf die in der Regel erheblichen Konsequenzen der Analysenergebnisse für Angeklagte bzw. Patienten. Darüber hinaus wird die Publikation relevanter Forschungsergebnisse in Fachzeitschriften durch die dokumentierte Einhaltung anerkannter Regeln erleichtert. Hartung et al. [148] betonen die vor allem langfristigen Kosten- und Effizienzvorteile eines umfassenden QM-Systems.

Ohnehin ist zu vermuten, dass die rechtsmedizinischen Institute, zumindest für gerichtsverwertbare Analysen, langfristig eine Zertifizierung durch eine beim Deutschen Akkreditierungsrat zugelassene Akkreditierungsstelle werden vorweisen müssen. In einem ersten Schritt in diese Richtung hat sich innerhalb der deutschsprachigen Fachorganisation der forensischen Toxikologen, der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh), der Arbeitskreis Qualitätssicherung (s. <http://www.gtfch.org>) gebildet. Durch diesen wurden bisher konkrete Vorschläge zunächst für diejenigen gerichteten Analysen ausgearbeitet, die in den meisten Instituten das Gros der Untersuchungen stellen, also für den Nachweis der häufigsten illegalen Drogen in Blut, Urin oder Haaren [149-153].

Die dort vorgestellten Überlegungen gehen im wesentlichen auf Vorstellungen zurück, wie sie in international vereinheitlichten Richtlinien und Normen, beispielsweise den Richtlinien der OECD über Gute Laborpraxis (GLP, [154]), der DIN ISO/IEC 17025 (1999) über allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Referenzlaboratorien oder der ISO 9000 über Qualitätsmanagementsysteme beschrieben werden.

Nach der Richtlinie Q2 für die "Validierung analytischer Prozeduren" der ICH (Internationale Konferenz zur Harmonisierung der technischen Anforderungen für die Zulassung von Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen) [155,156], die von den jeweiligen amerikanischen, europäischen und japanischen Zulassungsbehörden akzeptiert wird, gilt für den Begriff

Validierung folgende, vergleichsweise allgemein gehaltene Definition: "Das Ziel der Validierung einer analytischen Methode besteht darin, ihre Eignung für den beabsichtigten Zweck zu zeigen."

Als Anmerkung zur damals noch in der Entwurfsphase befindlichen DIN ISO/IEC 17025 führt Kromidas [157] dazu aus: "Die Schritte einer Validierung sollten folgende sein: Beschreibung der Anforderungen, Findung und Bestimmung von aussagefähigen Verfahrensmerkmalen, Vergleich der Anforderungen mit den erhaltenen Werten der Verfahrensmerkmale, Ja/Nein-Aussage über die Eignung der Methode für den vorgesehenen Gebrauch."

Ein wesentlicher Bestandteil einer Methodenvvalidierung ist demnach die Methodencharakterisierung, die demselben Autor zufolge folgendermaßen definiert ist:

"Charakterisiert wird eine Methode, indem man die Werte für ihre charakteristischen Kenngrößen ermittelt. Die Werte dieser Kenngrößen sind die Leistungs- oder Verfahrensmerkmalswerte der untersuchten Methode. Sie dienen zur Abschätzung der Unsicherheiten von Ergebnissen, die mit dieser Methode erzielt werden können."

Welche Methodenkenngößen ("figures of merit") sollen in diesem Zusammenhang in eine Charakterisierung mit einbezogen werden? Die ICH-Richtlinie Q2a [155] fordert als Minimum für eine rein qualitative Analyse nur die Absicherung der Spezifität der Methode. Bei zusätzlicher Gehaltsbestimmung sollten die Genauigkeit in Form von Richtigkeit und Präzision (Wiederhol- und Laborpräzision), der Arbeitsbereich und der funktionelle Zusammenhang zwischen Gehalt und Messgröße (i. d. R. Linearität) charakterisiert werden. Diese Begriffe werden in den folgenden Abschnitten noch näher erläutert.

Peters und Maurer [147] nennen als wichtige Kenngrößen quantitativer Bestimmungen zusätzlich zu den bereits genannten Parametern die Stabilität, Ausbeute und Robustheit sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze (s. Abschnitt 2.3.5). Genauere Regeln für die korrekte Ermittlung und den statistischen Umgang mit den einzelnen Parametern finden sich in der ICH-Richtlinie Q2b [156], im "ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement" (Zusammenfassung erhältlich als "technical note" TN 1297 des amerikanischen Standardisierungsinstitutes NIST, <http://www.nist.gov>) und bei Shah et al. [158].

Über die Validierung von analytischen Verfahren für die Systematische Toxikologische Analyse wurden bei der Literaturdurchsicht für die vorliegende Arbeit keine Veröffentlichungen gefunden. Viele der vorstehend aufgeführten, im wesentlichen für gerichtete Analysen durchgeführten Überlegungen lassen sich nicht ohne weiteres auf die Situation der ungerichteten Suchanalyse übertragen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden dazu Vorstellungen entwickelt, die in Abschnitt 4.2 zu finden sind.

2.3.2 Genauigkeit: Richtigkeit und Präzision

Jedes reale analytische Messergebnis ist mit einem Fehler behaftet, der sog. Messunsicherheit ("measurement uncertainty"), wobei im allgemeinen zwischen einem zufälligen und einem systematischen Anteil unterschieden wird. Ausgangspunkt ist die Vorstellung, dass tatsächlich ein "wahrer Ergebniswert" existiert; dann wird die (zufällige) Streuung der Messwerte um ihren

Mittelwert als "Präzision" ("precision", meist ausgedrückt als Standardabweichung oder Variationskoeffizient), die (systematische) Abweichung dieses Mittelwertes vom "wahren Wert" als "Richtigkeit" ("trueness", quantitativ: "bias") bezeichnet. Der Ausdruck "Genauigkeit" ("accuracy") fasst beide Parameter zusammen und drückt die Ergebnisunsicherheit eines einzelnen Messwertes aus.

Je nach der Länge des Zeitraums und der möglichen Veränderungen eines Messverfahrens werden verschiedene Arten der Präzision unterschieden [157]: Der Ausdruck "Wiederholpräzision" ("repeatability") kennzeichnet Messreihen, die innerhalb kurzer Zeitspannen an derselben Probe, nach demselben Verfahren, mit demselben Messgerät und im selben Labor von derselben Person durchgeführt werden. Dagegen wird unter "Vergleichspräzision" die Streuung von Messwerten verstanden, die zwar mit dem gleichen Analysenverfahren und an derselben Probe, aber in verschiedenen Laboratorien an verschiedenen (gleichartigen) Messgeräten durch unterschiedliches Personal ermittelt wurde. Zwischen diesen beiden Extrema liegt die "Laborpräzision / laborinterne Vergleichspräzision" ("intermediate precision"), bei der innerhalb eines Labors am selben Gerät zwar dieselbe Probe, allerdings über einen längeren Zeitraum, vermessen wird, wobei andere Parameter (Bearbeiter, Reagenziencharge, neuer Ansatz des Laufmittels etc.) variiert werden.

Ferner wird zwischen "Mess-" und "Methodenpräzision" unterschieden; während erstere an einer stabilen, reinen Lösung bestimmt wird und so nur den Einfluss der Messgeräte auf die Präzision widerspiegelt, wird bei letzterer der gesamte Analysengang (also z. B. auch inklusive der Probenaufarbeitung) erfasst. Für eine genaue Präzisionsbestimmung ist in jedem Fall eine ausreichend große Anzahl von Wiederholungsmessungen erforderlich.

Bei der Richtigkeit besteht das Problem, dass der "wahre Wert" eines Messergebnisses prinzipiell unbekannt ist, allenfalls steht - im Falle zertifizierter Referenzmaterialien - ein "Erwartungswert" zum Vergleich zur Verfügung. Bereits bei nicht zertifizierten Referenzsubstanzen kann auch eine Richtigkeitsaussage letztlich nicht ohne einen gewissen eigenen Fehler getroffen werden; korrekterweise müssten hier zweiseitige Signifikanztests (z. B. zweiseitiger t-Test zum Vergleich der Mittelwerte) erfolgen, normalerweise werden aber einseitige Tests durchgeführt, d. h. die Unsicherheit des Referenzwertes wird als vernachlässigbar gering angesehen, dann wird geprüft, ob der Erwartungswert innerhalb eines vorgegebenen Vertrauensintervalls der Verteilung der Messwerte liegt.

2.3.3 Selektivität

Kaiser [159] gibt folgende Definition der Selektivität: "Entsprechend der sprachlichen Herkunft bezeichnen wir ein Verfahren dann als (vollkommen) 'selektiv', wenn man mit ihm nebeneinander mehrere Komponenten in der Analysenprobe unabhängig voneinander bestimmen kann: das Analysenverfahren gestattet die *Auswahl*, welche Komponenten man bestimmen will und welche nicht."

Für das einfache Beispiel, dass in einer Probe die Gehalte c von n voneinander unabhängigen Komponenten c_1, c_2, \dots, c_n durch die Ermittlung von m voneinander unabhängigen Messwerten

x_1, x_2, \dots, x_m bestimmt werden sollen, führt der Autor die "Eichmatrix" (die im folgenden entsprechend heutigen Gepflogenheiten als "Kalibriermatrix" bezeichnet werden soll) der "partiellen Empfindlichkeiten" ein:

$$\begin{pmatrix} \gamma_{11} & \gamma_{12} & \dots & \gamma_{1n} \\ \gamma_{21} & \gamma_{22} & \dots & \gamma_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \gamma_{n1} & \gamma_{n2} & \dots & \gamma_{nn} \end{pmatrix}, \quad \gamma_{ik} = \frac{\partial x_i}{\partial c_k} \quad (5)$$

Die partiellen Empfindlichkeiten γ_{ik} geben die Empfindlichkeit des Wertes der Messgröße x_i der Substanz i gegenüber einer Änderung des Gehaltes c_k der Komponente k an.

Eine (vollkommen) selektive Messgröße wäre dann eine solche, bei der alle γ_{ik} -Werte außer γ_{ii} gleich Null wären, bei einem vollselektiven Messverfahren wären also lediglich die Elemente der Hauptdiagonalen der Kalibriermatrix von Null verschieden. Für jede Komponente gäbe es genau eine Messgröße, mit der ihr Gehalt selektiv bestimmt werden könnte. Umgekehrt wird die Selektivität der Messgröße x_i verringert, wenn neben γ_{ii} auch z. B. γ_{ik} von Null verschieden ist, denn in diesem Fall trägt auch der Gehalt c_k der Komponente k zur Messgröße x_i bei. Aus Gl. (5) leitet Kaiser dann eine Formel zur Quantifizierung der Selektivität Ξ her:

$$\Xi = \left[\frac{\min_{i=1..n} |\gamma_{ii}|}{\left(\sum_{k=1}^n |\gamma_{ik}| \right) - |\gamma_{ii}|} \right] - 1 \quad (6)$$

Hierin werden die Elemente der Hauptdiagonalen der Kalibriermatrix zur Summe aller anderen Elemente der betreffenden Zeile ins Verhältnis gesetzt, wobei nur solche γ_{ik} eingehen, die von Null verschieden sind. Anders ausgedrückt wird der Messwert für die eigentliche Komponente c_i ins Verhältnis zur Summe der Messwerte der störenden Komponenten k ($k \neq i$) gesetzt.

Gl. (6) gilt nur für Analysenverfahren, bei denen die Elemente der Hauptdiagonalen der Kalibriermatrix gleich oder größer sind als die Summe der restlichen γ_{ik} in der betreffenden Zeile. Dann überstreicht Ξ den Bereich von Null (fast nicht selektiv) bis Unendlich (voll selektiv). Es ist anzumerken, dass nach Gl. (6) die Selektivität einer Methode durch ihre unselektivste Messgröße gekennzeichnet wird.

2.3.4 Spezifität

In der Literatur wird der Begriff der Spezifität oft nicht eindeutig gebraucht. Wörtlich übersetzt bezeichnet der lateinische Ausdruck *specificus* "das, was eine Art (aus)macht". Ein spezifisches Analysenverfahren erlaubt es, "[...] eine Substanz oder eine Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren" [157].

In der vorliegenden Arbeit sollen Spezifität und Selektivität so voneinander abgegrenzt werden,

dass die eine die Voraussetzung für die andere darstellt: nur durch die Verwendung analytischer Messgrößen mit einem hohen Maß an Spezifität kann ein analytisches Verfahren letztlich hochselektiv werden. So verstanden, bezieht sich "Spezifität" also eher auf Messgrößen, "Selektivität" auf Messverfahren. Die konkrete Ausprägung einer Messgröße, das Messergebnis (z. B. ein UV-Spektrum), wäre in dieser Betrachtungsweise umso spezifischer, je charakteristischer sie für spezielle Substanzklassen oder sogar einzelne Verbindungen ist.

Gerade von Befürwortern der GC-MS als STA-Methode der Wahl wird diese Spezifität der HPLC-DAD, insbesondere den UV-Spektren, immer wieder abgesprochen. Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, diese Einschätzung zu überprüfen. Zunächst sollte hierfür allgemein ein qualitativer Eindruck von Variabilität und Aussagekraft der in der Spektrenbibliothek enthaltenen Daten vermittelt werden (Abschnitt 4.6).

Dem zweiten Ansatz, die Spezifität der in der Spektrenbibliothek enthaltenen UV-Spektren einzuschätzen, lag die folgende Überlegung zugrunde: sollten die Spektren wirklich für bestimmte Substanzgruppen charakteristisch sein, dann sollte es auch möglich sein, bei nicht in der Spektrenbibliothek enthaltenen Wirkstoffen aus dem UV-Spektrum heraus auf enthaltene Teilstrukturen oder sogar auf die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Wirkstoffgruppe zu schließen (Klassifizierung, s. Abschnitt 2.5.5). Neben dem Beleg hinreichender Spezifität würde damit auch die methodische Anwendungsbreite der HPLC-DAD für die STA erheblich erweitert.

2.3.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Während unter der Bezeichnung "Nachweisgrenze" die kleinste Substanzmenge verstanden wird, die noch qualitativ von einem analytischen Leerwert unterschieden werden kann, bezeichnet der Begriff "Bestimmungsgrenze" die kleinste Menge eines Stoffes, die noch mit einer vorgegebenen Genauigkeit quantitativ bestimmt werden kann. Die Verfahren zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze im Falle gerichteter Analysen finden sich u. a. in der DIN 32645 [160]. Eine Modifikation, bei der nicht die Streuung des Leerwertes, sondern diejenige im Bereich der zunächst geschätzten Nachweisgrenze als Grundlage dient, wurde in [161] veröffentlicht. Die Bestimmung von Nachweisgrenzen bei bekannten Signalüberlagerungen wird in [162] beschrieben. In [156] wird auch die im Laboralltag als Faustregel übliche Schätzung anhand des Signal-Rausch-Abstandes anerkannt (Nachweisgrenze: dreifaches, Bestimmungsgrenze: zehnfaches Grundrauschen). Die Eignung der verschiedenen Konzepte für die Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze im Rahmen der STA wird in Abschnitt 4.8 zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit diskutiert.

2.4 Vergleich der Leistungsfähigkeit von Analysenverfahren

2.4.1 Informationstheorie

Einen wichtigen Ansatz zur Charakterisierung der analytischen Leistungsfähigkeit, der "Identifikationskraft" einer Methode stellt die Informationstheorie dar. Ihr zufolge wird durch einen analytisch-chemischen Prozess Information aus einer Probe gewonnen (abgefragt) und in

ein Messsignal codiert, welches dann in einem zweiten Schritt in ein analytisches Resultat decodiert wird ([163], S. 5). Durch den informationstheoretischen Ansatz wird letztlich die Frage behandelt, ob das Maß der durch eine Analyse gewinnbaren Information ausreichend ist, die Zusammensetzung der Probe mit hinreichender Sicherheit zu ermitteln.

Einfach ausgedrückt und auf das Problem der STA übertragen, kann ein solcher Informationsgewinn darin bestehen, die vor einer Messung beispielsweise über die Zusammensetzung einer Probe bestehende Unsicherheit ("es könnte eine von vielen möglichen vergiftungsrelevanten Substanzen enthalten sein") durch die Messung zu reduzieren ("die vergiftungsrelevanten Substanzen A, B, und C waren enthalten, D, E und F dagegen nicht"). In diesem Zusammenhang werden auch die Begriffe "A-Priori-" bzw. "A-Posteriori-Unsicherheit" verwendet.

Um diese Unsicherheiten näher zu bestimmen, wurde durch Shannon und Wiener, bzw. Kulback das Konzept der "Informationsentropie" (erläutert in [164]) eingeführt. Die Analogie zur statistischen Definition der thermodynamischen Entropie nach Boltzmann ist beabsichtigt und soll kurz erläutert werden: Ein thermodynamisches System besteht aus Teilsystemen, die bestimmte Energiezustände besetzen können, beispielsweise kann ein Teilsystem die vollständige Energie des Gesamtsystems tragen, alle anderen nähmen dann Zustände der Energie Null ein. Eine andere Möglichkeit bestünde in der Gleichverteilung der Energie auf alle Teilsysteme. Die Zustände einzelner Teilsysteme werden auch als Mikrozustände bezeichnet, wohingegen die Verteilung der Energie auf alle Teilsysteme den Makrozustand des Gesamtsystems angibt. Die thermodynamische Entropie gilt dann als Maß für die "Ordnung" der Energieverteilung, sie ist um so größer, je "ungeordneter" die Energieverteilung ist.

In Analogie zu den in diesem Bild grundsätzlich zur Verfügung stehenden Energiezuständen werden die theoretisch möglichen Resultate einer chemischen Analyse als "analytische Zustände" bezeichnet. Besteht das Analysenverfahren beispielsweise aus der Verfolgung eines Farbumschlages von gelb nach rot, stehen lediglich zwei analytische Zustände zur Auswahl. Misst man den pH einer Lösung im Bereich von pH 7 bis pH 8 in Schritten von 0,1 pH, so ergeben sich elf verschiedene analytische Zustände (7,0/7,1/7,2/.../8,0). Wird die UV-Absorption einer Probe bei drei verschiedenen Wellenlängen auf einer Skala von jeweils 0 bis 1 Absorptionseinheiten (Abs) in Schritten von 100 mAbs gemessen, erhält man bereits $11^3 = 1.331$ mögliche analytische Zustände. Allgemein gesprochen bezeichnen die analytischen Zustände die Gesamtheit der im Ergebnisraum "erlaubten" Punkte.

Die Informationsentropie gilt dann als Maß für die "Ordnung" der Verteilung einer Probe auf die analytischen Zustände, sie ist um so größer, je "ungeordneter" diese ist. Ersetzt man "Unordnung" durch "Ungewissheit", wird die Parallele deutlicher. Bevor eine Probe einer chemischen Analyse unterworfen wird, ist unklar, welche analytischen Zustände sie besetzen wird, die Verteilung über diese Zustände ist "statistisch" und "ungewiss", sofern nicht schon Vorkenntnisse über die Probenzusammensetzung vorhanden sind. Wird die Messung dann durchgeführt, wird die tatsächliche Verteilung auf die analytischen Zustände erhalten (eine Farbe, ein pH-Wert, ein UV-Spektrum). Die nun über die Probe verfügbare Information ist größer und "geordneter/bestimmter" geworden, insbesondere dann, wenn bestimmten analyti-

schen Zuständen einzelne Substanzen eindeutig und ohne Störung durch andere Komponenten zugeordnet werden können, dann also, wenn das entsprechende Analysenverfahren spezifisch/selektiv (vgl. Abschnitte 2.3.3 und 2.3.4) ist.

Die Informationsentropie vor einer Messung wird als "A-Priori-Informationsentropie" und diejenige danach als "A-Posteriori-Informationsentropie" bezeichnet. Der Informationsgehalt einer analytischen Methode ist dann durch die Differenz zwischen A-Priori- und A-Posteriori-Informationsentropie gegeben. Hinter diesen Begriffen verbirgt sich ein stochastischer Ansatz ([165], Kap. 3), der kurz erläutert werden soll. Die grundlegende Formel für die A-Priori-Informationsentropie H_0 (der Index 0 soll hier die Ausgangssituation vor dem analytisch-chemischen Experiment kennzeichnen)¹ lautet nach Shannon:

$$H_0 = -\sum_{i=1}^n P_{0i} \lg P_{0i} \quad (7)$$

mit P_{0i} = A-Priori-Wahrscheinlichkeit für den analytischen Zustand i und \lg = dualer Logarithmus (Logarithmus zur Basis 2, Einheit: bit). Gl. (7) bezieht sich dabei auf diskrete analytische Zustände. Ein solcher Fall liegt beispielsweise vor, wenn eine Probe eine oder mehrere von n_0 möglichen Substanzen mit gleicher Wahrscheinlichkeit enthalten kann. Die Shannonsche Formel vereinfacht sich in diesem Fall zur *Hartley-Formel* (zitiert in [164]):

$$H_0 = -\lg n_0 \quad (8)$$

Die A-Posteriori-Informationsentropie H (also die nach Durchführung des Experiments verbleibende restliche "Ungewissheit" der Information) ist im wesentlichen auf Unsicherheitsfaktoren der Messmethode (z. B. Signalbreite) zurückzuführen. Nimmt man aber an, dass als Ergebnis das (gleich wahrscheinliche) Vorhandensein einer Untergruppe n der ursprünglich n_0 möglichen Substanzen gefunden worden wäre, so betrüge die A-Posteriori-Informationsentropie H dann in Analogie zu Gl. (8):

$$H = -\lg n \quad (9)$$

Damit ergibt sich der Informationsgehalt IC (Information Content) dieser Analysenmethode zu:

$$IC = |H_0 - H| = \left| \lg \frac{n_0}{n} \right| \quad (10)$$

und betrüge z. B. für die Bestimmung von einer aus zehn möglichen Substanzen 3,322 bit ($2^{3,322} \approx 10$). Das große Problem dieses eigentlich eleganten Ansatzes besteht in der exakten Beschreibung von H_0 und H in einer realen Situation. Für weitere einfache analytische Modellexperimente mit definierten Verteilungs- bzw. Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen (z. B. Normal-, Poisson-, Binomial- oder lognormale Verteilungen auf die möglichen analytischen Zustände) gelingt zumindest die Berechnung von H_0 , aber schon die Einbeziehung möglicher Messfehler macht die Rechnung aufwändig und kompliziert. Thieme und Müller [166]

¹ Der Buchstabe H bezeichnet in der physikalischen Chemie üblicherweise die Enthalpie und nicht die Entropie, für die der Buchstabe S verwendet wird. Um nicht unnötig zu verwirren, wurde hier jedoch die in allen Originalpublikationen gewählte Bezeichnung H beibehalten.

kommen zu dem Schluss, dass "[...] trotz aller statistischer Betrachtungen eine 'ab initio'-Berechnung realistischer Informationsentropien analytischer Prozeduren auf der Grundlage technischer Parameter kaum erfolgreich sein kann." Dazu wurden in [166] einige Gedanken weiter ausgeführt, die hier auf die STA mit HPLC-DAD übertragen werden sollen:

Geht man von 10^4 möglichen Verbindungen aus, betrüge nach Gl. (8) die A-Priori-Informationsentropie etwa 13,288 bit. Überschlägt man die sehr viel größere Informationskapazität eines mehrdimensionalen Analysenverfahrens wie der GC-MS oder der HPLC-DAD, so sollte es theoretisch ohne weiteres möglich sein, eine eindeutige Identifizierung aller in Frage kommenden Analyte durchzuführen, es sollte sogar ein enormer Informationsüberschuss anfallen. Tatsächlich liegt allerdings keinesfalls Gleichverteilung der Analyte auf die technisch möglichen analytischen Zustände vor. Vielmehr ist eine (ihrer Form nach unbekannte) statistische Verteilung zu erwarten, die allenfalls angenähert werden kann. Es kommt zu Signalüberlappungen, so dass Identifikationen nicht mehr eindeutig, sondern nur noch mit einer gewissen Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben werden können, um deren binären Logarithmus sich der mögliche Informationsgewinn reduziert.

Hinzu kommt der Umstand, dass die analytischen Variablen (hier: die Extinktionen im betrachteten Wellenlängenbereich) keinesfalls voneinander unabhängig sind. Da es sich bei UV-Spektren um Bandenspektren handelt, sind im Gegenteil z. B. auf den zu einem Absorptionsmaximum benachbarten Wellenlängen immer auch beträchtliche Absorptionswerte zu erwarten, was z. T. zu großer Redundanz führt (zu Redundanz und Relevanz von Messgrößen s. auch [167]). Ebenso ist die UV-Absorption der Analyte nicht über den gesamten erfassten Wellenlängenbereich gleichverteilt; so absorbieren alle in der hier beschriebenen Spektrenbibliothek erfassten Verbindungen an der unteren, kurzwelligen Messbereichsgrenze (im betrachteten Bereich nicht UV-aktive Substanzen sind in der eigentlichen Bibliothek nicht enthalten), aber nur sehr viel weniger Wirkstoffe (solche mit ausgedehnten delokalisierten π -Elektronensystemen) zeigen auch an der langwelligen Grenze des Messbereichs eine signifikante Absorption.

Die Zahl der durch das Verfahren nicht detektierbaren, gleichwohl aber für die Fragestellung relevanten Substanzen (eine Größe, die allenfalls grob geschätzt werden kann) trägt ebenfalls zu einer Verringerung von H_0 bei. Überlagerungen von UV-Spektren durch Störsubstanzen (z. B. endogene Substanzen, Fäulnisprodukte) führen schließlich noch zu einem weiteren Verlust an zugänglicher Information. All diese Einflüsse sind in der Regel äußerst schwer zu berechnen. Will man zudem unzulässige Verallgemeinerungen vermeiden, entsteht schnell ein hochgradig komplexes mathematisches System, das für die breite Anwendung in der Praxis nicht mehr zu vermitteln ist. Und selbst wenn Werte für die Informationsentropien a priori bzw. a posteriori nachvollziehbar berechnet werden könnten, bliebe doch der praktische Wert einer Aussage wie "...der Informationsgehalt des Analysenverfahrens beträgt 10 bit" unklar.

So erstaunt es nicht, dass nur wenig Literatur zur konkreten Anwendung der Informationstheorie in der analytischen Chemie zu finden ist (z. B. [93,168-170]). In [171] wird dennoch zu Recht darauf hingewiesen, dass durch den Einsatz der Informationstheorie einige neue bedenkenswerte Gesichtspunkte zum theoretischen Konzept der STA, insbesondere im Hinblick auf die Bewertung der Ergebnisunsicherheit, beigetragen werden.

2.4.2 Statistische Selektivitätsparameter

Der zweite Ansatz für einen Vergleich der Leistungsfähigkeit analytischer Messverfahren zur Substanzidentifikation bedient sich der deskriptiven Statistik. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, wie viele Analyte man mit der betrachteten Methode eindeutig identifizieren kann sowie für welche und wie viele Analyte bei gleichzeitigem Vorliegen in einer Probe die Identifizierung gegenseitig gestört würde. Für ein definiertes Substanzkollektiv können diese Daten nach vorheriger Festlegung der Identifikationskriterien durch Auszählung ermittelt werden. Anschließend stehen verschiedene Parameter zum Vergleich der Methodenselektivität zur Verfügung, die im folgenden vorgestellt werden. Dabei soll folgende Festlegung gelten: n = Anzahl der betrachteten Substanzen (bei n^2 miteinander verglichenen Substanzpaaren), u = Anzahl der als identisch gewerteten Paare.

Die sog. **Identifizierungsstärke** ("**Identification Power**" **IP**, [140,166]) einer Methode gibt die Anzahl der eindeutig identifizierbaren Substanzen an. Würden also z. B. alle Substanzpaare im Hinblick auf die Ähnlichkeit ihrer UV-Spektren überprüft, so gäbe die IP die Anzahl derjenigen Substanzen an, die mit den anderen Verbindungen lediglich Substanzpaare mit einem kleineren Ähnlichkeitswert als dem Schwellenwert bilden. Die IP wird durch einfaches Auszählen ermittelt und überstreicht den Bereich von Null bis n .

Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass zwei aus der Spektrenbibliothek zufällig ausgewählte Substanzen voneinander unterscheidbar sind, wird als "**Discriminating Power**" (**DP**, [90,91,93,94,100,118,142]) bezeichnet. Sie wird auf folgende Weise berechnet:

$$DP = 1 - \frac{u - n}{n \times (n - 1)} \quad (11)$$

mit n = Anzahl der betrachteten Substanzen, u = Anzahl der als identisch gewerteten Paare (s. o.). Der Zähler des zweiten Terms von Gl. (11) gibt die Zahl der als identisch gewerteten Paare in der Identifikationsmatrix abzüglich der Paare aus der Hauptdiagonalen an. Im Nenner dieses Terms findet sich die Anzahl aller möglichen Paarungen (wiederum ohne die Hauptdiagonale). Der gesamte zweite Term steht also für die Wahrscheinlichkeit, dass ein zufällig ausgewähltes Substanzpaar als identisch gewertet wird; folglich wird dieser Term noch von Eins subtrahiert, um die Wahrscheinlichkeit dafür zu erhalten, dass das Substanzpaar unterscheidbar ist. Die DP überstreicht den Bereich von Null ($u = n^2$, alle Substanzen ununterscheidbar) bis Eins ($u = n$, alle Substanzen sind lediglich von sich selbst nicht zu unterscheiden).

Im "**Mean-List-Length-Konzept**" (**MLL**, [4,108,118,140,172,173]) wird zunächst für jede Substanz die Anzahl der mit dem gegebenen Analysenverfahren von ihr nicht unterscheidbaren Verbindungen berechnet (die Substanz selbst eingeschlossen). Dieser Wert wird anschließend über alle Substanzen gemittelt. Es gilt dann folgende Formel:

$$MLL = \frac{u}{n} \quad (12)$$

Das Minimum bzw. Optimum liegt bei Eins (alle Substanzen sind lediglich von sich selbst nicht zu unterscheiden). Maximal ist die MLL gleich n (keine Substanz kann dann überhaupt von einer

anderen unterschieden werden). Zwischen Gl. (11) und Gl. (12) besteht folgende Beziehung:

$$DP = 1 - \frac{MLL - 1}{n - 1} \quad (13)$$

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ausgehend von der Kaiserschen Formel für die Selektivität Ξ (Gl. (6), S. 29) ein weiterer Parameter abgeleitet; zusätzlich wurden alle Selektivitätsparameter einer vergleichenden Bewertung unterzogen, die im Abschnitt 4.5.5 zu finden ist.

2.5 Multivariate Methoden

2.5.1 Der multivariate Raum

In Abschnitt 2.2.1 wurde bereits das Konzept des Ergebnisraumes eingeführt. Ein analytischer Prozess, der auf ein System aus m einzelnen Objekten k_1, k_2, \dots, k_m (z. B. ein Gemisch mehrerer Substanzen) einwirkt (z. B. durch Bestrahlung mit UV-Licht und die Registrierung der Extinktion), erzeugt im Ergebnisraum eine Datenstruktur (ein UV-Spektrum), d. h. eine konkrete Verteilung der Objekte auf die insgesamt möglichen analytischen Zustände (vgl. Abschnitt 2.4.1).

Die Datenstruktur, also die Anordnung der Messwerte im Ergebnisraum, wird auch als Muster (pattern) bezeichnet. Eine wichtige Aufgabe der Chemometrie besteht in der Auffindung und ggf. Interpretation solcher Muster. Dies wird unter dem Sammelbegriff "Mustererkennung" zusammengefasst, wobei Lewi [174] auf den Unterschied zwischen "pattern cognition" (auf deutsch etwa: Erkennen eines - unbekannten - Musters) und "pattern recognition" (Auffinden eines bereits bekannten Musters) hinweist. Es ist diese Muster(wieder)erkennung, die letztlich auch der in dieser Arbeit behandelten Substanzidentifizierung mittels einer Referenzdatenbank zugrunde liegt.

In derselben Arbeit beschreibt der Autor die zahlreichen Bedeutungsnuancen des Begriffes "Muster" sowie seine Entsprechungen in der Chemometrie und beleuchtet auch die philosophischen Aspekte des Themas. Demnach korrespondieren die in der Chemometrie üblichen Sichtweisen des multivariaten Raumes mit verschiedenen philosophischen Weltbildern:

In einer taxonomischen (griech. Táxis = Ordnung, Nómos = Regel, Gesetz, folglich bezeichnet dieser Begriff eine nach Regeln gebildete Anordnung) Weltsicht, wie sie etwa in der aristotelischen Philosophie zum Ausdruck kommt, wird der Verwandtschaftsgrad zwischen zwei Objekten in Begriffen von Ähnlichkeit und Unähnlichkeit beschrieben, jedoch nicht erklärt. Als Beispiel nennt Lewi hier die Systematik der Pflanzen nach Carl von Linné, bei der die betrachteten Objekte nach dem Grad an Übereinstimmung im Hinblick auf bestimmte Merkmale klassifiziert werden (und auf welche die spätere biologische Einteilung nach Familien, Arten und Gattungen zurückgeht). Auf den analytisch-chemischen Ergebnisraum bezogen bedeutet dies: zwei Verbindungen werden als umso ähnlicher aufgefasst, je näher die Punkte, durch die sie im Ergebnisraum repräsentiert werden, beieinander liegen. Betrachtet man den für diese Arbeit relevanten Ergebnisraum möglicher UV-Spektren, so würde hier die Ähnlichkeit zweier Spektren über den paarweisen Vergleich der Extinktionen Wellenlänge für Wellenlänge er-

folgen. Ein wichtiges chemometrisches Verfahren für die Zusammenfassung ähnlicher Objekte zu Gruppen stellt die weiter unten noch ausführlicher beschriebene Clusteranalyse dar.

Eine davon abweichende Weltsicht sieht in den Eigenschaften der Dinge nur die Repräsentation fundamentaler Einflussfaktoren. Diese Betrachtungsweise korrespondiert mit der platonischen Philosophie (platonische Körper bzw. Elemente, Höhlengleichnis). Lewi nennt hier ein Beispiel aus dem London des 19. Jahrhunderts, bei dem eine an verschiedenen, scheinbar unzusammenhängenden Punkten der Stadt ausgebrochene Choleraepidemie durch Eintragung dieser Punkte auf einem Stadtplan (Mustererkennung) auf gemeinsame, verseuchte Trinkwasserzuläufe zurückgeführt werden konnte (Mustererklärung). Nach diesem Modell würde die Ähnlichkeit zweier gemessener UV-Spektren durch das Vorhandensein typischer chromophorer Gruppen oder, noch exakter, durch zugrundeliegende, ähnliche elektronische Wellenfunktionen erklärt. In der Chemometrie findet diese Betrachtungsweise ihre Entsprechung in mustererklärenden Verfahren wie der Hauptkomponentenanalyse (s. u.).

In der Praxis finden - je nach Ziel einer Untersuchung - beide Konzepte Anwendung. Ein gutes Beispiel für diese duale Herangehensweise bildet das Mendelejewsche Periodensystem der Elemente (PSE), welches zunächst rein taxonomisch aufgestellt und später auf die Konfiguration von Atomkernen und Elektronen zurückgeführt wurde. Die Tatsache, dass mittlerweile verschiedene neuartige Darstellungsformen des PSE entwickelt wurden (spiralförmige, dreidimensionale und andere Darstellungsformen) unterstreicht die im folgenden dargelegte Bedeutung des Blickwinkels auf die Daten für ihre Interpretation.

Die Wahrnehmung eines Musters wird zunächst durch das Koordinatensystem der Messung vorgegeben. Ändert man dieses Koordinatensystem, verschiebt sich die Sicht des Betrachters auf die Daten. Ähnlich wie es für die Betrachtung eines Kunstwerkes verschiedene Blickrichtungen geben kann, aus denen die dargestellten Zusammenhänge unterschiedlich gut zu erkennen sind, gibt es auch im Ergebnisraum herausgehobene Betrachtungsrichtungen, die Zusammenhänge zwischen den Daten besonders deutlich werden lassen.

Man wird im multidimensionalen Raum allerdings keinen "Blickwinkel" finden, der das gesamte Datenmuster erfasst. Durch die Wahl der Perspektive werden zwangsläufig "nicht sichtbare" Informationen herausgefiltert. Christie [175] weist darauf hin, dass diese Datenreduktion ihre Entsprechung in der überlebensnotwendigen Filterung multidimensionaler Sinneseindrücke durch das Gehirn hat. Dabei entstehen hier wie dort Vor- und Nachteile: einerseits können komplexe Wahrnehmungen so überhaupt erst verarbeitet werden, andererseits birgt die Filterung das Risiko des Ausblendens wichtiger Information. Man sollte in jedem Fall versuchen, sich der Art und des Umfangs der Filterung stets bewusst zu bleiben, um zu einer erfolgreichen (d. h. nutzbaren) Beschreibung der Realität zu gelangen.

In der Regel werden als Resultat einer Messung die einzelnen Messwerte an den entsprechenden Koordinatenachsen der Variablen im Ergebnisraum abgetragen. Bestimmt man beispielsweise ([176], Kapitel 1) den anteiligen Gehalt von 20 verschiedenen Aminosäuren (Variable) in 50 verschiedenen Proteinen (Objekten), so ergeben sich 50 Messpunkte im 20-dimensionalen Ergebnisraum der Aminosäuren. Zwei Proteine ähnlicher Zusammensetzung liegen in diesem Raum eng beieinander. In einer hierzu komplementären Sichtweise können aber auch die 20

Aminosäuren als Punkte im 50-dimensionalen Ergebnisraum der Proteine dargestellt werden. Zwei in diesem Raum dicht beieinander liegende Punkte bezeichnen dann zwei Aminosäuren, deren Gehalte in allen untersuchten Proteinen ähnlich groß wären.

Aus anderer mathematischer Perspektive wird das Ergebnis einer Messung durch eine Matrix repräsentiert, in der (nach überwiegender Konvention) die Zeilen die Objekte und die Spalten die zugehörigen Variablen bezeichnen. Jede derartige Matrix erzeugt zwei komplementäre Ergebnisräume. Während der eine die Eigenschaften der Objekte widerspiegelt, können dem anderen die Eigenschaften der Variablen entnommen werden. Der Begriff des multivariaten Raumes soll beide Räume als Konnotation mitenthalten ([176], Kapitel 1).

Wenn die Dimensionalität der Matrix durch die Anzahl ihrer Zeilen und Spalten gegeben ist, kann die Dimensionalität des Datenmusters maximal gleich der kleinsten Matrixdimension sein (es kann also z. B. bei einer 3 x 5 - Matrix maximal dreidimensional sein) in der Realität ist sie oft geringer. Wenn die Daten z. B. in einem dreidimensionalen Ergebnisraum in einer Ebene oder auf einer Geraden liegen, wenn also die Zeilen (oder Spalten) der Matrix voneinander nicht linear unabhängig sind, enthält die Datenmatrix redundante Information.

Die gesamte Information der Messdaten kann dann durch ein niedrigerdimensionales Koordinatensystem vollständig beschrieben werden (im Falle der Ebene z. B. durch ein zweidimensionales). Die zur vollständigen Charakterisierung der Probe tatsächlich benötigte Dimensionalität wird auch als Rang der Matrix bezeichnet.

2.5.2 Prinzipien und Ziele multivariater chemometrischer Verfahren

Das oberste Ziel der hier behandelten, multivariaten chemometrischen Analyseverfahren besteht in der Regel darin, Objekte (hier: chemische Verbindungen) voneinander zu unterscheiden, bzw. umgekehrt, sie anhand ihrer gemessenen Eigenschaften zu identifizieren oder einer Gruppe ähnlicher Verbindungen zuzuordnen. Gleichzeitig sollen, wenn möglich, zugrundeliegende Einflussgrößen aufgefunden werden, welche die Wechselwirkung des Analysenverfahrens mit den Objekten kennzeichnen. Dies geschieht ggf. durch Entfernung redundanter Information (Filterung) und anschließende Rotation oder anderweitige Transformation des ursprünglichen Koordinatensystems (Veränderung des Blickwinkels). Die entsprechenden chemometrischen Verfahren werden im folgenden vorgestellt.

2.5.3 Hauptkomponentenanalyse

Für eine effiziente Unterscheidung zwischen mehreren, in einer Probe potenziell vorhandenen Substanzen sollen diese in einem möglichst niedrigdimensionalen Ergebnisraum (geringerer ökonomischer Aufwand) möglichst gut aufgetrennt werden. Aus mathematischer Sicht bedeutet dies, diejenigen voneinander linear unabhängigen Variablen (Messgrößen) zu finden, in denen die Objekte maximal streuen. Hierzu legt man in den multivariaten Raum zunächst eine neue Achse, entlang derer die Varianz des Datenmusters (die Ausdehnung der durch die Messergebnisse gebildeten Punkteschar) maximal ist. Die verwendeten Algorithmen sollen hier

nicht besprochen werden, sie sind in Standardwerken wie z. B. [144,176,177] zu finden. Anschließend sucht man senkrecht dazu eine weitere Achse, entlang derer die noch verbliebene Streuung wieder maximal ist. Dieses setzt man fort, entweder bis zu einer vorgegebenen Reststreuung (Residualvarianz), oder bis keine weitere Streuung zwischen den Daten mehr zu beobachten ist.

Insgesamt resultiert ein orthogonales Koordinatensystem, dessen Achsen durch einen neuen Satz voneinander linear unabhängiger "Variablen" gebildet werden, die als "Faktoren" bezeichnet werden. Wird die Varianz des Datenmusters durch die Faktoren vollständig beschrieben, werden diese als "Hauptkomponenten" bezeichnet (engl.: principal components, PC, das zugehörige Verfahren nennt sich dann Hauptkomponentenanalyse bzw. principal component analysis, PCA). Die Hauptkomponenten können als Linearkombination der ursprünglichen Variablen beschrieben werden. Ihre Konstruktion verläuft sehr ähnlich wie die im Abschnitt 2.5.5 auch graphisch dargestellte Ermittlung der Diskriminanzfunktionen bei der Diskriminanzanalyse (s. dort Abb. 10). Die Hauptkomponenten fassen die ursprünglichen Messgrößen zusammen und entfernen dadurch redundante Information. Im Falle hochgradig redundanter, z. B. spektroskopischer Daten wird ein Großteil der Varianz meist schon durch wenige Hauptkomponenten erklärt.

Als Ergebnis einer PCA werden zum einen die Koordinaten der Objekte im neuen Koordinatensystem erhalten, die sog. Faktorenwerte (scores). Sie geben an, wie groß der Einfluss der betreffenden Hauptkomponente auf das jeweilige Messobjekt ist. Zum anderen erhält man die Koeffizienten der Linearkombination, die sog. Ladungen (loadings). Sie spiegeln wider, welche der ursprünglichen Variablen an der durch diese Hauptkomponente beschriebenen Streuung den größten Anteil haben. Die Wechselbeziehung von Objekten und Variablen im multivariaten Raum lässt sich so auch in den Hauptkomponenten wiederfinden.

In aller Regel stellen die Hauptkomponenten nicht direkt messbare Einflussgrößen dar, sie werden deshalb auch als latente Variable bezeichnet. Ein Hauptproblem der PCA liegt in deren inhaltlicher Deutung. Gelingt diese, so können ansonsten durch die Methode nicht direkt messbare Parameter (z. B. Lipophilie, Molekülgeometrie oder Substitutionsmuster), die in den ursprünglichen Variablen "verborgen waren", zugänglich werden. Auf diese Weise könnten u. U. auch im Zusammenhang mit der UV-Spektroskopie sog. qualitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen (qualitative structure activity relationships, QSAR) entdeckt werden. Eine Weiterverfolgung dieses Ansatzes hätte den Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings gesprengt. Gelingt keine inhaltliche Interpretation der PCA, so wird durch die Entfernung der Redundanz die anfallende Datenmenge in jedem Fall deutlich reduziert und gleichzeitig besser aufgetrennt, so dass die Weiterverarbeitung mittels gruppierender und klassifizierender Verfahren (s. Abschnitte 2.5.4 und 2.5.5) erleichtert wird.

Veröffentlichungen zur Faktoranalyse bzw. PCA im Zusammenhang mit der HPLC-DAD betreffen beinahe ausschließlich die Auflösung überlagerter Peaks (peak deconvolution) im Rahmen der Multikomponentenanalyse, wie sie z. T. auch bereits in fortschrittliche HPLC-Software implementiert wurde. Eine nähere Erläuterung dieser Verfahren findet sich z. B. in [178], Beispiele aus der Literatur sind im Abschnitt 2.5.7 aufgeführt.

2.5.4 Gruppierung: Clusteranalyse

Als Voraussetzung dafür, prüfen zu können, ob eine unbekannte Substanz nur über ihr Spektrum einer Gruppe ähnlicher Substanzen zugeordnet werden kann (s. Abschnitt 2.3.4), ist es zunächst einmal notwendig, solche Gruppen überhaupt aufzufinden. Diese können schlicht auf empirischer Grundlage vorgegeben (überwachtes Lernen) oder durch Computeralgorithmen aus den Rohdaten oder den Hauptkomponenten der PCA ermittelt werden (unüberwachtes Lernen).

Die Clusteranalyse fasst Objekte anhand des Abstandes ihrer Variablen im Ergebnisraum (oder im neu ermittelten Raum der Hauptkomponenten) mit Hilfe eines Fusionierungsalgorithmus zu Gruppen zusammen. Sie kann damit Gruppen von Objekten mit ähnlichen Eigenschaften entdecken, diese Ähnlichkeiten jedoch nicht erklären. Gleichwohl kann man durch Analyse der vorgenommenen Gruppierung Gemeinsamkeiten zwischen den Objekten zu finden versuchen, die zu der festgestellten Ähnlichkeit geführt haben könnten.

Bei den sog. partitionierenden Clustermethoden wird zunächst ein Optimierungskriterium vorgegeben, z. B. das Varianzkriterium:

$$V_g = \sum_{k=1}^{m_g} \sum_{i=1}^n (x_{ikg} - \bar{x}_{kg})^2 \quad (14)$$

mit g = Gruppenindex, m_g = Anzahl der Objekte in Gruppe g , n = Anzahl der einbezogenen Variablen, x_{ikg} = Wert der Variablen i für das Objekt (die Verbindung) k aus Gruppe g und \bar{x}_{kg} = Mittelwert der Variablen x_i in Gruppe g . Gl. (14) steht für die Streuung der Messwerte innerhalb der Gruppe g .

Man beginnt mit einer willkürlich gewählten Gruppeneinteilung und untersucht, welche Verschiebung eines Elementes in eine andere Gruppe zu einer maximalen Verminderung des Kriteriums führt. Dann werden die Gruppenmittelwerte erneut berechnet. Der Vorgang wird wiederholt, bis eine weitere Optimierung nicht mehr möglich ist. Das Ergebnis hängt jedoch stark von der gewählten Ausgangsgruppierung ab und findet nur lokale Minima des Kriteriums.

Bei den hierarchischen Clusterverfahren gibt es zwei Strategien: die "divisiven" Verfahren gehen von der gesamten Gruppe der zu untersuchenden Objekte aus und teilen sie schrittweise in kleinere Gruppen. Bei den "agglomerativen" Verfahren fasst man umgekehrt die einzelnen Objekte Schritt für Schritt zusammen. Dieser Weg ist der gebräuchlichste und fand, u. a. auch wegen der durch die vorhandene Software vorgegebenen Rechenmöglichkeiten, in der vorliegenden Arbeit Verwendung. Die folgenden Erklärungen beziehen sich ebenfalls nur auf diesen Fall.

Zunächst wird ein Ähnlichkeits- bzw. Abstandsmaß gewählt. Will man beispielsweise die Ähnlichkeit zwischen vollständigen UV-Spektren berechnen, wäre der Similarity Index (s. Abschnitt 2.2.3) geeignet, der Ähnlichkeiten des Kurvenverlaufs untersucht. Sind dagegen eher die Abstände in den einzelnen Variablen (hier: Wellenlängen) gefragt, so werden andere Abstandsmaße, beispielsweise aus der Minkowski-Metrik (Manhattan- bzw. City-Block-Distanz, (quadrierte) euklidische Distanz) bzw. die Pearson- oder die Mahalanobis-Distanz verwendet [144,179,180], auf die hier nicht näher eingegangen werden kann.

Anschließend werden die Abstände zwischen allen Objekten berechnet. Die beiden Objekte mit der geringsten Distanz (größten Ähnlichkeit) werden zu einem Cluster zusammengefasst. Die Berechnung der Abstände dieses neuen Objektes zu allen anderen geht je nach Verfahren von unterschiedlichen Werten aus: beim Single-Linkage-Verfahren wird als Abstand zwischen der Gruppe g und dem Objekt m derjenige des zu m nächstgelegenen Elementes der Gruppe verwendet (Nearest-Neighbour-Methode), beim Complete-Linkage-Verfahren dagegen derjenige des entferntesten (Furthest-Neighbour-Methode).

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Ward-Verfahren wiederum kombiniert diejenigen Objekte bzw. Cluster, für die das Varianzkriterium, Gl. (14), minimal wächst. Dieses Verfahren führt zu möglichst homogenen Clustern [181].

Ein alternatives, graphisches Clusterungsverfahren wird in [182] vorgeschlagen: Für jedes Objekt werden zunächst die Distanzen zu allen anderen Objekten berechnet, in der Reihenfolge absteigender Größe sortiert und auf den Bereich von Null bis Eins normiert. Das zum Objekt i n -nächste Objekt k erhält die relative Objektnummer n (also das nächste die Nummer 1, das zweitnächste die Nummer 2 usw.). In der Auftragung des normierten Abstandes gegen die relative Objektnummer entstehen charakteristische Kurven, die sog. Distanzkurven, die zusammen mit ihren Ableitungen Aufschluss über Zahl und Größe der in den Daten vorhandenen Cluster geben können.

2.5.5 Klassifizierung: Diskriminanzanalyse

Die Diskriminanzanalyse (DA) ermöglicht die Untersuchung von Unterschieden zwischen verschiedenen, durch überwachtes oder unüberwachtes Lernen vorgegebenen Gruppen multivariater Datensätze. Einerseits wird festgestellt, ob die Gruppen überhaupt voneinander unterschieden werden können, zum anderen werden diejenigen Variablen gefunden, die für die Unterscheidbarkeit von maßgeblicher Bedeutung sind. Zuletzt können mit dieser Methode neue Datensätze einer der vorhandenen Gruppen zugeordnet werden (Klassifizierung). Da das Verfahren in der vorliegenden Arbeit einen wichtigen Platz einnimmt, soll es im folgenden zum besseren Verständnis etwas ausführlicher dargestellt werden.

Um zwischen zwei Gruppen von Objekten zu unterscheiden, wird bei der Diskriminanzanalyse eine Linearkombination der ursprünglichen Variablen gebildet, die sog. Diskriminanzfunktion Y . Sie hat die allgemeine Form:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i \quad (15)$$

mit x_i = ursprüngliche Variable i und b_i = zugehöriger Diskriminanzkoeffizient. Dabei besitzen einige der ursprünglichen Variablen ein stärkeres Gewicht für Y (und damit für die Gruppenunterscheidung) als andere, dieses spiegelt sich im Betrag des zugehörigen Diskriminanzkoeffizienten wider.

Für jedes Objekt (jede Verbindung) lässt sich mit Hilfe von Gl. (15) durch Einsetzen der ursprünglichen Messwerte x_i ein eigener sog. Diskriminanzwert Y_m , für jede Gruppe von

Objekten ein gemittelter Diskriminanzwert \bar{Y}_g , der sog. "Gruppenzentroid", berechnen.

Bei der Konstruktion der Diskriminanzfunktion als Linearkombination der ursprünglichen Variablen handelt es sich um eine Koordinatentransformation (vgl. Abschnitt 2.5.2) auf neue, die sog. Diskriminanzachsen. Dieser Prozess verläuft sehr ähnlich wie bei der Hauptkomponentenanalyse (vgl. Abschnitt 2.5.3). Anders als dort werden die neu konstruierten Achsen jedoch nicht so in den Ergebnisraum gelegt, dass die Streuung zwischen den einzelnen Objekten maximiert, sondern so, dass die Streuung zwischen den vorgegebenen Gruppen maximal, innerhalb der Gruppen dagegen minimal wird. Dies wird auch als Diskriminanzkriterium Γ bezeichnet, das dann maximiert werden soll:

$$\Gamma = \frac{\text{Streuung zwischen den Gruppen}}{\text{Streuung innerhalb der Gruppen}} = \frac{\sum_{g=1}^G m_g (\bar{Y}_g - \bar{Y})^2}{\sum_{g=1}^G \sum_{i=1}^{m_g} (Y_{ig} - \bar{Y}_g)^2} \quad (16)$$

mit Γ = Anzahl der Gruppen, m_g = Gruppenstärke (Zahl der in Gruppe g enthaltenen Substanzen), Y_{ig} = Diskriminanzwert des Objektes i aus Gruppe g , \bar{Y}_g = Gruppenzentroid der Gruppe g und \bar{Y} = Mittelwert über die Diskriminanzwerte aller Gruppen. Abb. 10 zeigt die graphische Konstruktion der Diskriminanzachse für den Fall der Trennung zweier Gruppen.

Der in Abb. 10 dargestellte Vorgang kann, dann allerdings weniger anschaulich, auch für mehr als zwei Gruppen durchgeführt werden. Für G Gruppen lassen sich auf diese Weise $G-1$ Diskriminanzachsen ermitteln, die den sog. Diskriminanzraum bilden. Der Anteil der durch die jeweilige Diskriminanzfunktion Y_k beschriebenen Streuung nimmt mit wachsendem k ab. Das optimierte Diskriminanzkriterium Γ wird im Mehrgruppenfall als Eigenwert γ bezeichnet. Es gilt:

$$\gamma_1 \geq \gamma_2 \geq \dots \geq \gamma_{G-1} \quad (17)$$

Die Y_k werden auch als kanonische Diskriminanzfunktionen bezeichnet. Als Maß für das relative Gewicht einer Diskriminanzfunktion für die Unterscheidbarkeit der Gruppen, ihre "diskriminatorische Bedeutung", wird der Eigenwertanteil EA_k eingeführt:

$$EA_k = \frac{\gamma_k}{\sum_{i=1}^{G-1} \gamma_i}; \quad \sum_{i=1}^{G-1} EA_i = 1 \quad (18)$$

In der Regel nimmt das Gewicht mit fortschreitendem k schnell ab, so dass meist nur zwei Diskriminanzfunktionen benötigt werden. Ist dies der Fall, so kann man die zweite gegen die erste auftragen und in diesem Koordinatensystem sowohl die Elemente als auch die Variablen graphisch darstellen.

Für die Klassifizierung neuer Objekte (Verbindungen), also ihre Zuordnung zu einer der vorgegebenen Gruppen, werden verschiedene Konzepte verfolgt. Beim Distanzkonzept wird der individuelle Diskriminanzwert Y_m (s. o.) des neuen Objektes mit denjenigen der Gruppenzentroide

verglichen. Das Element wird dann derjenigen Gruppe zugeschlagen, zu deren Zentroid im Diskriminanzraum der geringste Abstand besteht. Verschiedene Abstandsmaße stehen zur Verfügung (s. Abschnitt 2.5.4), meist wird die quadrierte euklidische Distanz verwendet. Beim Wahrscheinlichkeitskonzept, das von der in dieser Arbeit verwendeten Statistiksoftware verwendet wurde, soll ein Objekt i derjenigen Gruppe g zugeordnet werden, für welche die sog. A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit $P(g|Y_m)$ maximal ist. Diese bezeichnet die aufgrund von Y_m ermittelte Wahrscheinlichkeit dafür, dass das einer Gruppe zugeordnete Element dieser Gruppe wirklich angehört.

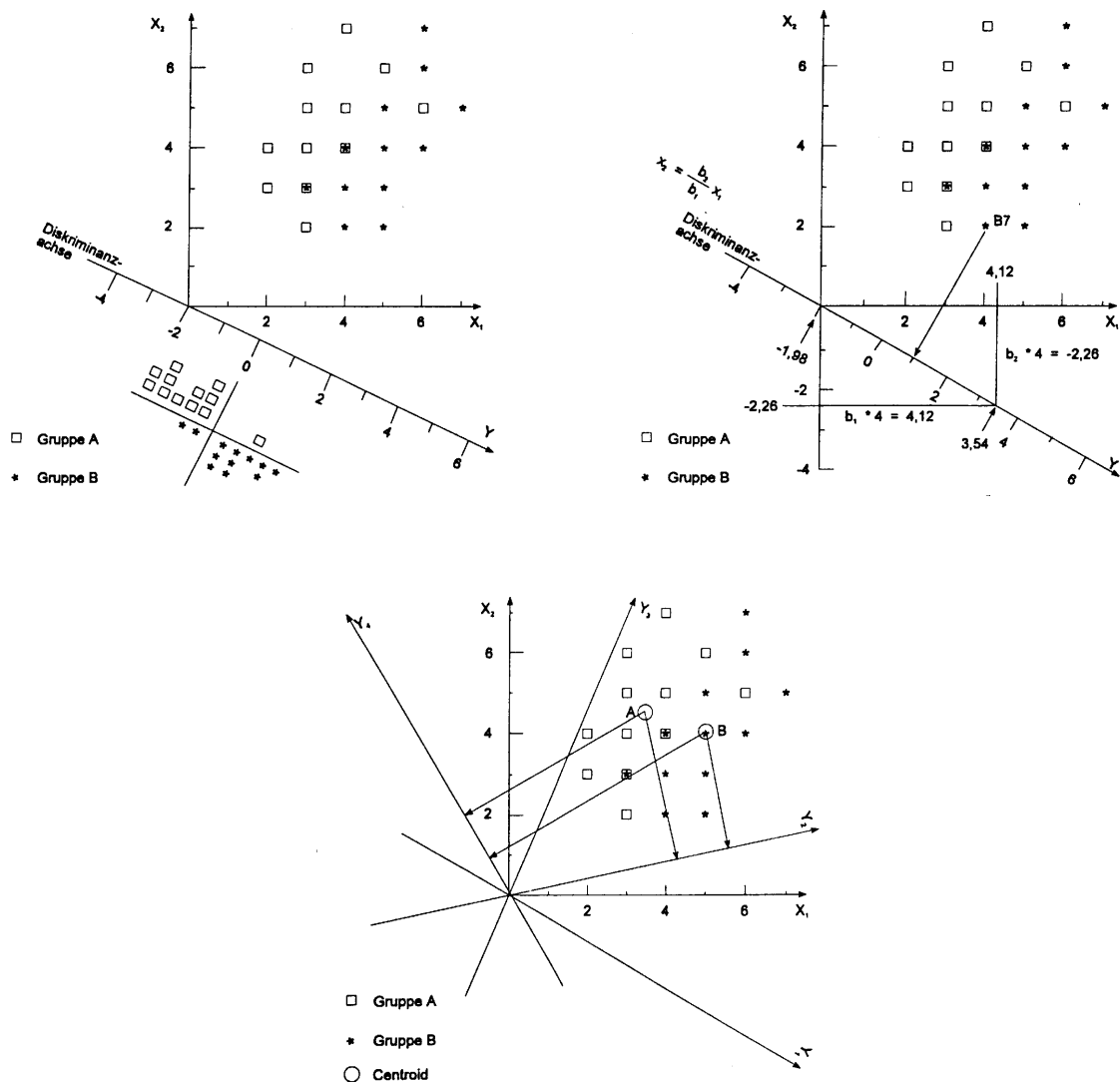


Abb. 10: Graphische Darstellung der Konstruktion der Diskriminanzfunktionen (aus [181]). Zu sehen ist die Trennung zwischen zwei verschiedenen Gruppen von Objekten (bezeichnet mit einem Stern bzw. einem Quadrat). Oben links: Darstellung der optimalen Diskriminanzachse, oben rechts: Konstruktion dieser Diskriminanzachse und Ermittlung der Diskriminanzkoeffizienten durch lotrechte Projektion auf die ursprüngliche Achse. Unten: Darstellung von vier verschiedenen gewählten Diskriminanzachsen. Diejenige Achse trennt optimal, auf der die lotrechten Projektionen der Gruppenmittelpunkte (Zentroide, im Bild als Kreise dargestellt) die maximale Entfernung voneinander einnehmen.

Eine wichtige Grundlage für die DA bildet die sog. (Varianz-)Kovarianzmatrix ([144], S.139):

$$C = \begin{pmatrix} s_{11}^2 & cov(1,2) & \cdots & cov(1,n) \\ cov(2,1) & s_{22}^2 & \cdots & cov(2,n) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ cov(n,1) & cov(n,2) & \cdots & s_{nn}^2 \end{pmatrix} \quad (19)$$

Die Kovarianz ist dabei definiert als:

$$cov(j,k) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n [(x_{ij} - \bar{x}_j)(x_{ik} - \bar{x}_k)]; \quad j,k = 1 \dots n; j \neq k \quad (20)$$

Diese Matrix gibt an, wie stark die betreffende Variable x_j unter dem Einfluss der Variablen x_k streut. Für $j = k$ ergibt sich die Varianz s_{jj}^2 , die in der Hauptdiagonalen der Kovarianzmatrix zu finden ist. Für linear unabhängige Variable ergibt sich eine Kovarianz von Null.

Vor Beginn einer DA stellt sich die Frage nach der Varianzenhomogenität der Kovarianzmatrix. Dabei soll geklärt werden, ob sämtliche Variablen über alle Gruppen in einem vergleichbaren Umfang streuen (eine wesentliche Voraussetzung der DA, da sonst Verzerrungen befürchtet werden müssen). Dies kann mit der (in die Statistiksoftware implementierten) Methode "Box' M-Test" festgestellt werden, auf die hier aus Platzgründen nicht näher eingegangen werden soll. Liegt keine Varianzenhomogenität vor, so müssen für jede Gruppe eigene Kovarianzmatrizen verwendet werden (erhöhter Rechenaufwand). Man kann Varianzenhomogenität auch durch eine Vorbehandlung der Daten im Sinne einer Autoskalierung (einer Normierung jeder Variablen auf einen Mittelwert von Null und eine Standardabweichung von Eins) erreichen.

Im Falle der hier untersuchten UV-Spektren wurde allerdings eine Überbetonung eigentlich unbedeutender spektroskopischer Extrema bzw. spektralen Rauschens befürchtet. Daher wurden die Spektren lediglich auf das Maximum Eins normiert, um über alle Variablen wenigstens eine einheitliche Größenordnung herzustellen. Im Falle festgestellter Varianzeninhomogenität wurde dann stets mit gruppenspezifischen Kovarianzmatrizen gerechnet.

Die Qualität der ermittelten Diskriminanzfunktionen kann überprüft werden, indem man die aus der DA resultierende Klassifizierung von Elementen mit der tatsächlichen Gruppenzugehörigkeit vergleicht oder indem man vom Diskriminanzkriterium abgeleitete Güteparameter berechnet.

Im ersten Fall berechnet man einfach die "Trefferquote" (das Verhältnis der Anzahl richtiger Zuordnungen zu den möglichen Zuordnungen). Man kann auch eine sog. Klassifikationsmatrix ("confusion matrix") aufstellen, in der für alle Gruppen die tatsächliche Gruppenzuordnung ihrer Elemente gegen die durch die DA prognostizierte aufgetragen wird (in absoluten Fallzahlen und in Prozent). Diese Matrix enthält in ihrer Hauptdiagonalen die Werte der korrekt zugeordneten Elemente. Eine weitere Möglichkeit der Überprüfung bietet die sog. Kreuzvalidierung. Hierbei wird jeweils ein Objekt ausgelassen, also quasi als unbekannt behandelt, die DA wird für die restlichen Elemente berechnet. Anschließend wird für das ausgelassene Objekt eine Gruppenzuordnung vorgenommen, deren Ergebnis mit der vorgegebenen Gruppenzugehörigkeit verglichen wird.

Für eine Überprüfung der Güte einer Diskriminanzfunktion stehen verschiedene Güteparameter

zur Verfügung wie z. B. der "kanonische Korrelationskoeffizient" c (entspricht der Wurzel des Quotienten aus erklärter und Gesamtstreuung) oder "Wilks' Λ " (Quotient aus nicht erklärter und Gesamtstreuung), mit dessen Hilfe man eine χ^2 -Verteilung erhält, um die statistische Signifikanz der Diskriminanzfunktion zu prüfen. Der kanonische Korrelationskoeffizient stellt ein Maß für das Gewicht einer bestimmten Variablen in einer Diskriminanzfunktion dar, für ihre diskriminatorische Bedeutung bezüglich nur dieser Funktion.

Eine weitere wichtige Fragestellung besteht darin zu erkennen, ab der wievielten Diskriminanzfunktion kein signifikanter Beitrag zur Gruppenunterscheidung mehr geleistet wird. Dazu bedient man sich für k bereits ermittelte von K möglichen Diskriminanzfunktionen des sog. Wilks' Λ für die residuelle Diskriminanz, also für die verbleibende Streuung zwischen den Gruppen im Verhältnis zur Streuung innerhalb der Gruppen. Wird die residuelle Diskriminanz insignifikant, kann die Ermittlung weiterer Diskriminanzfunktionen unterbleiben. Ist sie bereits für $k = 0$ insignifikant, so bedeutet dies, dass kein Hinweis auf signifikante Gruppenunterschiede vorliegt.

Daneben ist auch die Frage von Bedeutung, ob alle ursprünglichen Variablen für die Gruppenunterscheidung relevant sind. Eine Möglichkeit, dies herauszufinden, besteht darin, zunächst eine Diskriminanzanalyse mit allen Variablen durchzuführen und nachträglich solche Variablen mit nur geringer Bedeutung auszusondern. Dagegen bezieht das Verfahren der "schrittweisen Diskriminanzanalyse" (stepwise discriminant analysis, SDA) die Variablen nacheinander in die Diskriminanzanalyse ein, beginnend bei derjenigen Variablen mit der größten Relevanz. Neben der damit verbundenen Datenreduktion (Verringerung der benötigten Rechenkapazität) werden so von vornherein nur diskriminatorisch wichtige Variable aufgenommen. Damit ähnelt diese Methode stark der bereits vorgestellten PCA. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich eingesetzt.

Nach der bisherigen Klassifizierung hat man für ein Element die wahrscheinlichste Gruppenzugehörigkeit festgestellt, es ist allerdings nicht zwingend, dass das Element überhaupt zu einer der Gruppen gehört. Ein Maß hierfür stellt die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(Y_m|g)$ dar. Sie wird über den Prozentsatz derjenigen Gruppenelemente errechnet, deren Diskriminanzwert einen größeren Abstand vom Zentroid hat als derjenige des neu zuzuordnenden Elementes. Ist dieser Prozentsatz gering, so ist die Zugehörigkeit des neuen Elementes insgesamt eher unwahrscheinlich.

2.5.6 Andere Verfahren

Neben der beschriebenen sog. kanonischen Diskriminanzanalyse gibt es eine Reihe weiterer, in der Chemometrie z. T. sogar gebräuchlicherer Klassifizierungsverfahren. Eine direkte Alternative zur SDA ist die lineare Diskriminanzanalyse nach Fisher (LDA), die die Objekte direkt im Ergebnisraum klassifiziert. Sie darf jedoch bei bestehender Varianzeninhomogenität (s. o.) nicht angewendet werden.

Neben Abwandlungen der Diskriminanzanalyse, wie z. B. der RDA (regularised discriminant analysis) oder der FDA (Flexible Discriminant Analysis, [183]) wurden auch das

"Multidimensionale Scaling", die "Methode der k-nächsten-Nachbarn" (kNN) sowie vor allem das "SIMCA-Verfahren" (Soft Independent Modelling of Class Analogies) eingesetzt. Beim SIMCA wird für jede einzelne Gruppe separat eine PCA durchgeführt, wobei sich von Gruppe zu Gruppe eine unterschiedlich große Anzahl von Hauptkomponenten ergeben kann (vgl. Abb. 11). Ein neu hinzukommendes Objekt wird dann derjenigen Gruppe zugeordnet, in deren Modell es am besten passt.

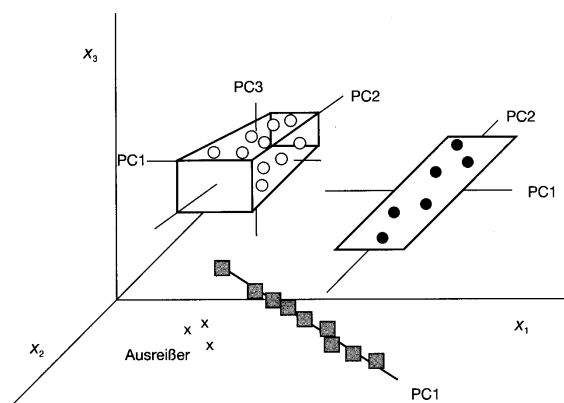


Abb. 11: SIMCA-Modelle für drei Klassen mit unterschiedlicher Zahl signifikanter Hauptkomponenten (aus [144]).

Software, die über die entsprechenden Algorithmen verfügt hätte, stand für die vorliegende Arbeit leider nicht zur Verfügung.

2.5.7 Anwendungsbeispiele aus der Literatur

Andersson et al. [184] unterzogen die UV-Spektren aller 209 polychlorierten Biphenyle (PCB) einer Hauptkomponentenanalyse. In der Auftragung der Faktorenwerte in der Ebene der ersten beiden Hauptkomponenten ("score plot") wurde sichtbar, dass die erste Hauptkomponente die betrachteten Substanzen vor allem nach ihrem Grad an ortho-Substitution (Störung der Koplanarität und damit der Delokalisation der π -Elektronen im Chromophor) auftrennte. Dies war im übrigen die einzige bei der Literaturrecherche zur vorliegenden Arbeit gefundene Untersuchung von UV-Spektren mittels Hauptkomponentenanalyse.

Detroyer et al. [185] untersuchten mittels PCA das Retentionsverhalten von 83 Wirkstoffen aus fünf pharmakologischen Stoffgruppen an acht verschiedenen HPLC-Trennsystemen. Der ersten Hauptkomponente konnte die übergeordnete Eigenschaft "Hydrophilie/Hydrophobie" zugeordnet werden, was durch Korrelation der Faktorenwerte mit dem Logarithmus des Oktanol-Wasser-Koeffizienten untermauert werden konnte. Die zweite Hauptkomponente trennte eher nach "Säure- bzw. Baseverhalten" der jeweiligen Substanzen. Im score plot der ersten beiden Hauptkomponenten konnten die fünf Wirkstoffgruppen gut unterschieden werden. Eine Clusteranalyse sowohl der Rohdaten als auch der Faktorenwerte aus der Hauptkomponentenanalyse zeigte, dass die Ermittlung der pharmakologischen Gruppenzugehörigkeit aus den von Redundanz freien Hauptkomponenten ein sehr viel besseres Ergebnis lieferte.

Dirinck et al. [186] konnten Amphetaminanaloga mittels Hauptkomponentenanalyse nach ihrer Wirkung (stimulierend bzw. halluzinogen) unterscheiden. Datengrundlage waren hier die FT-IR-Spektren der untersuchten Substanzen. In einer weiteren Untersuchung [187] teilten die Autoren diese Verbindungen und ihre Heptafluorbutyrat-Derivate in vier Gruppen, für die jeweils die drei ersten Hauptkomponenten bestimmt wurden. Diese wurden dann dazu benutzt, im Rahmen des SIMCA-Verfahrens (s. o.) ein Modell für jede Gruppe zu erstellen, anhand dessen neu hinzukommende FT-IR-Spektren zugeordnet werden sollten.

Giacomelli et al. [188] untersuchten das Retentionsverhalten von Nitroanilinen an Kieselgel in der Normalphasen-HPLC mittels Hauptkomponentenanalyse und fanden eine Trennung entlang der ersten beiden Hauptkomponenten in Korrelation zur Fähigkeit der Analyte, Wasserstoffbrücken auszubilden. Romano et al. [189] führten an dünnstschichtchromatographischen R_F -Werten von 443 Wirkstoffen auf vier verschiedenen Trennsystemen eine PCA durch, die ersten beiden Hauptkomponenten erklärten 70,8 % der Varianz. Die Autoren nutzten dieses Ergebnis, um neu gemessene Substanzen anhand ihrer Faktorenwerte einer bereits gemessenen Substanz zuzuordnen. Schoonjans et al. [190] untersuchten mittels PCA, Clusteranalyse und "Sequential Projection Pursuit" (SPP) die Eignung von Mid-IR-Spektren von 61 pharmazeutischen Wirkstoffen für die Bewertung molekularer Ähnlichkeit im Rahmen von QSAR-Untersuchungen.

Moss et al. [191] führten eine Clusteranalyse an IR-Spektren von 15 illegalen Drogen durch und interpretierten die gefundene Gruppenzuordnung anhand struktureller Überlegungen. Sondermann und Kovar [192] klassifizierten mehrere Sätze sichergestellter Ecstasytabletten im Hinblick auf die Wirkstoffgehalte anhand von IR-Spektren mit Hilfe des "Partial-Least-Squares-Verfahrens" (PLS). Ein Übersichtsartikel [193] behandelt das sog. Profiling von Heroinproben mit dem Zweck der Herkunftsbestimmung. Unter den beschriebenen Methoden befinden sich auch die Hauptkomponenten- und die lineare Diskriminanzanalyse (LDA).

Verfahren zur Klassifizierung finden in einem breiten interdisziplinären Bereich Anwendung: Brody et al. [194] klassifizierten Beinproben (Stoßzähne und Knochen) mit PCA und DA an FT-IR-Spektren zur Überwachung des Artenschutzes, Kemsley [195] klassifizierte normale und "extra vergine"-Olivenöle anhand von 80 IR-Spektren von Vertretern beider Gruppen mittels LDA (nach Datenreduktion mit PCA bzw. dem Partial-Least-Squares-Verfahren). Mallet et al. [183] gelang die Zuordnung von 165 VIS / NIR-Spektren zu drei Typen von Seegrass mit DA-Methoden. Park et al. [196] konnten mittels SDA Brandy- von Whiskeysorten anhand der GC-MS-Profile von zwölf enthaltenen organischen Säuren unterscheiden. Pérès et al. [197] nutzten dieselbe Methode für die Klassifizierung verschiedener Käsesorten mittels SPME-MS. Salvatore et al. [198] verwendeten die Diskriminanzanalyse zur Diagnose und Prognose von Lebererkrankungen aufgrund klinisch-chemischer Markerbestimmungen.

Faktoranalyseverfahren zur Auflösung überlagerter chromatographischer Peaks ([178,199-203]) im Rahmen der Multikomponentenanalyse oder zur Entfernung von spektralem Rauschen [204] spielten für die vorliegende Arbeit keine Rolle und sollen daher hier auch nicht näher beschrieben werden. Arbeiten über Klassifizierungen auf der Grundlage von UV-Spektren wurden nicht gefunden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Das HPLC-DAD-Messverfahren

Das verwendete HPLC-DAD-Verfahren hat sich seit vielen Jahren in der Abteilung Toxikologische Chemie am Institut für Rechtsmedizin der Humboldt-Universität bewährt. Eine umfangreichere Beschreibung der Methode findet sich u.a. in [99],[205] und vor allem [34]. Für die Untersuchungen im Routineeinsatz werden Vollblut- bzw. Serumextrakte (saure und basische Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan) oder Eiweißfällungen (Serum wird im Verhältnis 1:1 mit Acetonitril versetzt) über ein isokratisches Trennsystem, bestehend aus RP₈-Säule und einer von drei verschiedenen mobilen Phasen (Eluent "A", "B" oder "C") aufgetrennt und mittels Photodiodenarraydetektion erfasst.

3.1.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Lösungsmittel: Dichlormethan, Acetonitril von Fa. Merck, Darmstadt (Qualität UVASOL).

0,1 N HCl: Herstellung durch Verdünnen kommerzieller Maßlösungen (Titrisol, Fa. Merck).

Phosphatpuffer pH 2,3: Herstellung durch Auffüllen von 4,8 ml H₃PO₄ (85 %, Fa. Merck) und 6,66 g KH₂PO₄, Fa. Reanal, Budapest, Ungarn, mit Aqua bidest. (über KMnO₄ destilliert) auf 1000 ml.

Tris-Puffer pH 9,0: Herstellung durch Auflösen und Auffüllen von 24,3 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ("Tris", Fa. Merck) mit Aqua bidest. (über KMnO₄ destilliert) auf 1000 ml.

Laufmittel: 588 ml Acetonitril + 1000 ml Phosphatpuffer ("Eluent A"), bzw. 750 ml Acetonitril + 450 ml Phosphatpuffer ("Eluent B") oder 200 ml Acetonitril + 800 ml Phosphatpuffer ("Eluent C").

Standards für die RRT-Berechnung: 5-(p-Methylphenyl)-5-phenylhydantoin (MPPH, Fa. Serva, Heidelberg) für Eluent A, 4-Phenylbenzophenon (p-PBP, Fa. Boehringer, Mannheim) für Eluent B und Salicylamid (Fa. Berlin-Chemie, Berlin) für Eluent C.

3.1.2 Geräte für die Probenaufarbeitung

Pipetten/Spritzen: Pipetten mit Volumina zwischen 10 und 1.000 µl, Fa. Eppendorf, Hamburg, mit Pipettenspitzen "Standartips", ebenfalls Fa. Eppendorf, Mikroliterspritze 200 µl, Fa. Hamilton, Reno, USA.

Waage: Laborwaage R 180 D, Fa. Sartorius, Göttingen.

Gefäße: Für die Extraktion 1-ml-Standardreaktionsgefäße 3810, Fa. Eppendorf, für die Messung 1-ml-Spitzvials Typ Flasche G 1s, klar, mit Schraubdeckel und Dichtscheibe G8-1.3, Fa. CS-Chromatographie Service, Langerwehe.

Mixer: Vortex-Mixer Typ VF2, Fa. IKA, Staufen, und Mixer 5432, Fa. Eppendorf.

Zentrifugen: Für die Gewinnung von Serum aus Vollblut Labofuge 400, Fa. Heraeus, Hanau, für das Zentrifugieren im Rahmen von Extraktion oder Eiweißfällung Centrifuge 5410, Fa. Eppendorf.

Abdampfvorrichtung: Evaporator 2366, Fa. Liebisch, Bielefeld.

3.1.3 Vorschriften für die Probenvorbereitung

Saure Extraktion: In einem 1-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden zu 500 µl Blut oder Serum 100 µl 0,1 N HCl und 400 µl Dichlormethan zugesetzt. Das Gemisch wurde ca. 1 min lang gevortext und anschließend 5 min lang zentrifugiert. Mit einer Mikroliterspritze wurden dann 200 µl aus der unteren Phase abgezogen und in ein 1-ml-Spitzvial überführt. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C (Heizblock) im Stickstoffstrom verdampft, der Rückstand wurde in 100 µl mobiler Phase aufgenommen, wovon in der Regel 50 µl in die HPLC-Anlage injiziert wurden.

Basische Extraktion: Der Ablauf entsprach demjenigen der sauren Extraktion, nur wurde anstelle von HCl Tris-Puffer pH 9,0 (ebenfalls 100 µl) zugegeben.

Eiweißfällung: Falls Vollblut vorlag, wurde i. d. R. durch Zentrifugieren Serum gewonnen. Von diesem wurden je nach verfügbarer Menge z. B. 200 µl in ein 1-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt, dann wurde das gleiche Volumen Acetonitril zugesetzt. Anschließend wurde das Gemisch 5 min lang durchgerührt (Eppendorf-Mixer). Die Probe wurde ca. 1 min lang zentrifugiert, vom Überstand wurden dann 100 µl in ein Spitzvial überführt. Es wurden in der Regel ebenfalls 50 µl in die HPLC-Anlage injiziert.

Alle vorgestellten Verfahren sind nach Abzentrifugieren auch aus Urin durchführbar, für Organproben existieren gesonderte Vorschriften.

3.1.4 Geräte für die HPLC-Messungen

Im folgenden sind die Geräte aufgeführt, die im Rahmen der Neumessung der Spektrenbibliothek zum Einsatz kamen. Die Messungen wurden in der Abt. Toxikologische Chemie des Instituts für Rechtsmedizin der HU Berlin an zwei in Reihe geschalteten Diodenarraydetektoren der Firma Shimadzu, Kyoto, Japan, und der Fa. Bio-Tek, Neufahrn, durchgeführt. Während diese Detektoren sowie die verwendete Art Trennsäule unverändert blieben, kamen über den mehrjährigen Messzeitraum die nachfolgend aufgeführten Geräte teilweise in unterschiedlichen Kombinationen zum Einsatz. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse beziehen sich - sofern nicht extra gekennzeichnet - sämtlich auf die Messung mit dem Detektor der Fa. Shimadzu. Routinemessungen im Rahmen der STA werden in der Abteilung ebenfalls nur auf der Shimadzu-Anlage (und auf Vorläufermodellen) durchgeführt.

Entgasung der mobilen Phase: Degasys DG 1210, Fa. Uniflows, Tokio, Japan (bezogen durch Fa. VDS Optilab, Berlin) und 3-Kanal-Degasser, Fa. Bio-Tek.

HPLC-Pumpen: LC 6A und LC 9A, Fa. Shimadzu, Pumpe Typ 525, Fa. Bio-Tek.

Autoinjektoren: SIL-9A und SIL-10AXL, Fa. Shimadzu und Sampler Typ 560, Fa. Bio-Tek.

Trennsäule: Lichrospher RP8ec, 5 μm , 250 x 4 mm, Fa. Merck, gefüllt von Fa. Macherey & Nagel, Düren, mit Vorsäule Lichrospher RP8ec, 5 μm , 8 x 4 mm.

Detektoren: Photodiodenarraydetektor M10Avp, Fa. Shimadzu, und Diodenarraydetektor Typ 540, Fa. Bio-Tek.

Soft- und Hardware: Shimadzu CLASS-VP 5 auf IBM-PC mit Windows 95 und 64 MB Arbeitsspeicher bzw. Bio-Tek KromaSystem 2000 auf IBM-PC mit Windows NT 4.0 und 128 MB Arbeitsspeicher.

3.1.5 Probenvorbereitung für die STA

Im Regelfall wurden ein saurer und ein basischer Extrakt sowie zusätzlich eine Eiweißfällung angefertigt. Während Neutralstoffe in beiden Extrakten zu finden waren, enthielt der saure Extrakt zusätzlich saure Wirkstoffe in ihrer Neutralform, in der sie auch im (sauer eingestellten) Eluenten vorlagen. Dieser Extrakt wurde daher im elutionsstärkeren Laufmittel B (mit höherem Acetonitrilgehalt) gemessen, das die Elution lipophiler Verbindungen beschleunigt. Im basischen Extrakt waren dagegen auch Wirkstoffe mit basischen Zentren enthalten, die in der sauren mobilen Phase meist als Kationen vorlagen und entsprechend weniger stark auf der RP₈-Säule retiniert wurden. Für diesen Extrakt wurde daher zur besseren Auftrennung der schwächere Eluent A eingesetzt. Zeigten sich hier relevante, aber stark überlagerte Signale im frühen Teil des Chromatogramms, wurde die Messung im Laufmittel C mit noch einmal geringerem Acetonitrilgehalt wiederholt.

3.1.6 Messbedingungen für die STA

Die jeweilige mobile Phase wurde isokratisch mit einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ im Kreislauf durch das System geführt, d. h. sie wurde nach Passieren des Detektors wieder in das Vorratsgefäß geleitet. I. d. R. wurde ein Volumen von 50 μl injiziert (wenn verfügbar), die Analysenzeit betrug meist 30 min, die Detektion erfolgte im Bereich von 195 - 380 nm mit einer Auflösung von 1 nm, die Spektren wurden alle 2 sec abgespeichert.

Die Retentionszeiten der Referenzsubstanzen für die RRT im jeweiligen Laufmittel wurden täglich bestimmt. Zur Auswertung einer Messung wurde die Retentionszeit jedes relevanten Peaks notiert und in die RRT umgerechnet. Dann wurde das UV-Spektrum aus dem Peakmaximum gegen den Matrixuntergrund korrigiert (Subtraktion des gemittelten Spektrums aus denjenigen zu Peakbeginn und am Peakende) und durch Vergleich mit den Einträgen der Spektrenbibliothek im betreffenden RRT-Bereich - sofern möglich - identifiziert.

Die Quantifizierung erfolgte im Schnellverfahren - unter Berücksichtigung der unabhängig bestimmten Extraktionsausbeuten - per Dreisatz durch Vergleich der für den betreffenden Wirkstoff in der Spektrenbibliothek gespeicherten Fläche für 1 μg Substanz bei 225 ± 5 nm (s. u.) oder durch eine Wiederholungsmessung, bei der dem Blut bzw. Serum eine definierte

Menge dieses Wirkstoffes zugesetzt wurde (Standardadditionsverfahren). Größere Serien, in denen derselbe Wirkstoff zu bestimmen war, kamen meist nicht vor, so dass i. d. R. von einer Mehrpunktkalibrierung abgesehen wurde. Die gefundenen Konzentrationen wurden mit Tabellenwerken [206,207] verglichen, in denen für mehrere Hundert der gängigsten Medikamentenwirkstoffe Referenzwerte für die Kategorien "therapeutischer", "toxischer" bzw. "komatös-letaler Bereich" verzeichnet waren. Diese Einstufung wurde zusammen mit der Konzentrationsangabe als semi-quantitativer Befund an den Auftraggeber übermittelt. Im allgemeinen vergingen von Analysenbeginn bis zur Ergebnisübermittlung etwa eineinhalb bis zwei Stunden (EMIT-Screening und Blutalkoholbestimmung eingeschlossen).

3.2 Messung der Spektrenbibliothek

3.2.1 Auswahl der Substanzen

Die Auswahl der Substanzen für die Spektrenbibliothek erfolgte für Medikamentenwirkstoffe anhand der Roten Liste, des halbjährlich erscheinenden Verzeichnisses der in Deutschland zugelassenen verschreibungspflichtigen Medikamente [14], das zur Ergänzung der Bibliothek durch neue Wirkstoffe regelmäßig durchgesehen wurde. Pestizide wurden auf der Grundlage des "Pesticide Manual" [15] ausgewählt. Substanzgruppen von grundlegender (forensisch-)toxikologischer Bedeutung wie z. B. illegale Drogen, Lösungsmittel, PCB, PAK etc., sowie eine Vielzahl von Metaboliten wurden ebenfalls aufgenommen. Durch das langjährige Wachstum der Bibliothek sind auch zahlreiche heute nicht mehr zugelassene Wirkstoffe enthalten, die dennoch nach wie vor in Vergiftungsfällen auftreten können. Zum größten Teil wurden die gemessenen Substanzen von den jeweiligen Herstellern kostenlos abgegeben, weitere Stoffe, insbesondere aus der Gruppe der Pestizide, wurden bei den Firmen Promochem, Riedel de Haën oder Dr. Ehrenstorfer gekauft. Standards illegaler Drogen wurden u. a. von den Unternehmen Sigma, Radian oder Lipomed erworben.

3.2.2 Datenregistrierung und Kennzeichnung der Wirkstoffe

Für jeden in die Spektrenbibliothek aufgenommenen Wirkstoff wurden bei der Registrierung einige zusätzliche Informationen recherchiert: Strukturformel, Chemical-Abstracts-Nummer (CAS-Nummer), INN (internationaler Freiname) oder IUPAC-Bezeichnung, Molmasse, vorliegende Substanzform (z. B. Hydrochlorid, Natriumsalz, Maleat etc., prozentualer Gehalt) und die hauptsächliche Wirkung bzw. das wichtigste Anwendungsgebiet. Als Informationsquellen dienten die Substanzzetteln der Hersteller, das Synonymverzeichnis für organisch-chemische Medikamentenwirkstoffe von Negwer [13], das Pestizidhandbuch von Tomlin [15], die "ChemID"- bzw. später die "ChemID Plus"-Datenbank der US-amerikanischen Nationalen Bibliothek für Medizin im Internet (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus>), die ABDATA-Stoffliste der Bundesvereinigung deutscher Apothekerverbände [208], das Römpp Chemielexikon [209] und die Chemical-Abstracts-Datenbank zunächst auf CD-ROM, später über den Netzzugang der Berliner Charité (via SciFinder Scholar 2001).

Jeder Substanz wurde eine interne Codenummer zugeordnet, die sich aus dem Anfangsbuchstaben des internationalen Frei- bzw. des IUPAC-Namens, einer fortlaufend vergebenen dreistelligen Zahl und dem Buchstaben "b" (sofern die Substanz im Laufmittel B gemessen wurde; Eluent A oder C: kein Buchstabe), zusammensetzte. Beispiele: das Analgetikum Ibuprofen, die erste aufgenommene Substanz mit dem Anfangsbuchstaben I, wurde in Laufmittel B gemessen und erhielt daher die Codenummer I001b; das Neuroleptikum Perazin (Laufmittel A) erhielt den Code P098. Des weiteren wurde jeder Wirkstoff in Abhängigkeit von seiner Wirkung bzw. seinem Hauptanwendungsgebiet einer von zwölf Unterbibliotheken zugeordnet (s. Abschnitt 4.1.1).

3.2.3 Qualitätskontrolle der Geräte

Vor jeder Serie wurde eine Kontrolllösung vermessen, um verschiedene Gerätefunktionen zu überprüfen. Diese enthielt - analog zu den Stammlösungen der für die Spektrenbibliothek gemessenen Wirkstoffe (s. u.) jeweils in einer Konzentration von 1 mg ml^{-1} - die folgenden Verbindungen: Histamin (Histamindihydrochlorid, Fa. Merck) zur Bestimmung der Totzeit des HPLC-Systems, Coffein (Apotheke des Universitätsklinikums Charité) zur Überprüfung der Peakflächenkonstanz, MPPH (s. o., Fa. Serva) als Retentionszeitstandard für die Berechnung der RRT in Eluent A und Benzol (ohne Angabe) zur Kontrolle der Spektrenqualität und -richtigkeit (Lage und Form der Vibrationsfeinstruktur). Bei Serien in Eluent B oder C wurden gesonderte Messungen des jeweiligen Standards (p-PBP bzw. Salicylamid) durchgeführt. Für die Erstellung der Bibliothek wurde stets frischer Eluent verwendet (keine Kreislaufführung), ansonsten galten die im Abschnitt 3.1.6 geschilderten Messbedingungen.

3.2.4 Durchführung und Auswertung der Messungen für die Spektrenbibliothek

Anhand der ermittelten Strukturformel wurde zunächst abgeschätzt, in welcher mobilen Phase eine Elution innerhalb von 30 min zu erwarten war. Dann wurden ca. 1 mg der zu messenden Substanz eingewogen und zu einer Stammlösung der Konzentration 1 mg ml^{-1} in dem betreffenden Laufmittel aufgelöst. Für Wirkstoffe, die als hydrolyseempfindlich eingestuft wurden, wurde reines Acetonitril bzw. ein Gemisch von ACN und Aqua bidest. (also ohne sauren Puffer) mit der anteiligen Zusammensetzung der jeweiligen mobilen Phase verwendet. Von der Stammlösung wurden 20 μl (entsprechend 20 μg Wirkstoff in der eingewogenen Form, s. o.) abgenommen und kurz vor der Messung mit mobiler Phase auf 1 ml aufgefüllt. Hiervon wurden dann 50 μl in die HPLC injiziert, so dass - ohne Berücksichtigung des prozentualen Gehaltes der Ausgangssubstanz - absolut 1 μg Wirkstoff vermessen wurde.

Für die Spektrenbibliothek wurde das UV-Spektrum aus dem Peakmaximum gewählt (nach Korrektur gegen den Untergrund, s. o.) und im Format der jeweiligen HPLC-Software sowie als ASCII-Datei (Textdatei mit den Wellenlängen-Extinktions-Wertepaaren in zweispaltiger Anordnung) abgespeichert. Darüber hinaus wurden die berechnete relative Retentionszeit, die Peakfläche bei $225 \pm 5 \text{ nm}$ (gemittelter Wert im Bereich von 220 – 230 nm), sowie die ersten vier spektroskopischen Maxima (ab 200 nm), die ersten vier Minima und die ersten drei

spektroskopischen Schultern notiert. Die kompletten Messdaten wurden auf CD-ROM gesichert, um den späteren Zugriff auf Peakflächen bei anderen Wellenlängen zu ermöglichen.

In einigen Fällen erwiesen sich die Substanzen als unerwartet hydrolyseempfindlich, so dass die Messung unmittelbar nach Auflösen des jeweiligen Wirkstoffes wiederholt werden musste. Darüber hinaus wurde in einer größeren Anzahl von Fällen zunächst innerhalb der dreißigminütigen Analysenzeit kein Signal beobachtet. War die Messung in Eluent A erfolgt, so wurde sie bei gleicher Messzeit in Laufmittel B wiederholt, war sie in Laufmittel B durchgeführt worden, so wurde bei der Wiederholungsmessung die Analysenzeit auf 60 Minuten ausgedehnt. War bis zu diesem Zeitpunkt kein Analysensignal aufgetreten, wurde - von Ausnahmefällen abgesehen, bei denen Peaks in nachfolgenden Messungen anderer Wirkstoffe mitregistriert wurden - keine RRT eingetragen, stattdessen wurde die Anmerkung "RT > 60 min in mobiler Phase B" gespeichert. Für diese Verbindungen wurden - sofern in der Ausgangssubstanz keine UV-aktiven Begleitstoffe oder Gegenionen enthalten waren - die UV-Spektren gemessen, indem die Trennsäule durch einen aus einer mehrere Meter langen Teflonkapillare bestehenden Abstandshalter ohne Trennwirkung ersetzt wurde.

3.2.5 Datenbanken

Die erfassten Daten wurden zunächst in einer Datenbank in MS Access [210] erfasst (Datenbank "HPLCTOX"), die - mit Ausnahme der gemessenen Peakflächen - auch an die Käufer der Spektrenbibliothek abgegeben wird. Darüber hinaus wurden nach den recherchierten Angaben sämtliche 2.888 Strukturformeln in Isis Draw [211] gezeichnet. Als zusätzliche Sicherung wurde jeder Datensatz mitsamt UV-Spektrum und Strukturformel als Karteikarte ausgedruckt.

Beides, Daten und Formeln, wurde dann in einer neuen Datenbank unter Isis Base [212] zusammengefasst ("Substanzdatenbank"). Auf diese Weise standen sämtliche Datensätze in einer nach chemischen (Teil-)Strukturen durchsuchbaren Form zur Verfügung. Diese Datenbank bildete die Grundlage für viele weitere im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchungen. Mit ihrer Hilfe wurden sämtliche vorhandenen Chromophore (vgl. Abschnitt 2.1.8) erfasst, fortlaufend durchnummeriert und in einer eigenen Isis-Base-Datenbank gespeichert ("Chromophorendatenbank"). Nach Abschluss dieser Arbeiten wurden wiederum in die Substanzdatenbank für jede Substanz die Nummern der in ihr enthaltenen Chromophore eingetragen.

3.2.6 Qualitätskontrolle der Messergebnisse

Sämtliche Messdaten wurden mehrfach hinsichtlich der korrekten Erfassung, der Plausibilität des Messergebnisses und der Konsistenz der erfassten Daten überprüft. Insofern aus der weniger umfangreichen Vorgängerversion Daten zur Verfügung standen, wurden diese mit den neuen Ergebnissen verglichen, bei neu hinzugekommenen Substanzen wurden - falls verfügbar - über eine Datenbanksuche in der Substanzdatenbank (s. o.) die Ergebnisse strukturell ähnlicher Verbindungen für einen Vergleich herangezogen.

3.3 Wiederfindung, Präzision und Richtigkeit

3.3.1 Probenvorbereitung: Wiederfindung

Für die in Tab. 44, S. 144, aufgeführten Substanzen wurde die Wiederfindung als Mittelwert der Ergebnisse von Doppelbestimmungen bei einer Serumkonzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (gespiketes Leerserum) gemessen. Es wurden sowohl eine basische als auch eine saure Extraktion (jeweils in Doppelbestimmung) durchgeführt. Das Ergebnis derjenigen Methode mit dem besseren Resultat wurde dann in die Ergebnistabelle aufgenommen. Der dort ebenfalls angegebene Variationskoeffizient wurde als Quotient aus der Abweichung der Einzelbestimmungen vom Mittelwert und dem Mittelwert selbst gebildet.

3.3.2 Probenvorbereitung: Präzision

In Tab. 4 sind die Herstellerangaben zu Präzision und Richtigkeit der verwendeten Pipetten wiedergegeben.

Tab. 4: Spezifikationen des Herstellers für die verwendeten Pipetten vom Typ Eppendorf Reference variable.

Pipette	Volumen / μl	Richtigkeit / %	Präzision / %
10 – 100 μl	10	2,5	0,7
	50	0,8	0,3
	100	0,8	0,15
100 – 1.000 μl	100	1,6	0,3
	500 – 1.000	0,6	0,2

Die Messunsicherheit der für die Einwaagen der Substanzstammlösungen verwendeten Laborwaage Sartorius RD 180 wurde vom Hersteller mit 0,01 mg angegeben, bei einer Einwaage von durchschnittlich 1 mg der Referenzsubstanzen entspricht dies einem relativen Fehler von einem Prozent.

Zur Kontrolle der Pipettierfehler wurde eine Testreihe mit vier Personen mit unterschiedlicher Laborerfahrung durchgeführt, die jeweils 15mal 20 μl Wasser in ein Gefäß auf der Waage pipettieren sollten.

3.3.3 Präzision und Richtigkeit der UV - Spektren

Die Spezifikationen der verwendeten Diodenarraydetektoren (Herstellerangaben) sind in Tab. 5 wiedergegeben.

Die kommerzielle Fassung der Spektrenbibliothek wurde außerhalb der Abt. Toxikologische Chemie des Instituts für Rechtsmedizin der HU Berlin auch auf einer Anlage der Firma Hewlett-Packard (heute Fa. Agilent, Waldbronn) gemessen, daher wurde der Detektor HP 1090 hier mit aufgeführt.

Tab. 5: Spezifikationen der für die Messung der Spektrenbibliothek verwendeten Detektoren

Detektor	DAD 540	HP 1090	SPD-M10AVP
Hersteller	Bio-Tek Instruments	Hewlett-Packard	Shimadzu
Anzahl Dioden	512	512	512
Wellenlängenbereich	200 – 610 nm	190 – 600 nm	190 – 800 nm
Auflösung pro Diode	0,8 nm	2 nm	1,2 nm
Spaltbreite	Kein Spalt, Lichtleiter	Variabel 2 – 8 nm	1,2 nm
Wellenlängenkalibrierung bzw. Überprüfung der Genauigkeit	D ₂ -Lampenspektrum	D ₂ -Lampenspektrum und Holmiumfilter	D ₂ -Lampenspektrum und Holmiumfilter
Wellenlängengenauigkeit	± 1 nm	± 1 nm	± 1 nm
Lampe(n)	D ₂	D ₂ + W	D ₂ + W
Durchflusszelle	10 mm / 8 µl	10 mm / 13 µl	10 mm / 10 µl
Rauschen / Absorptionseinheiten	$< \pm 1,0 \times 10^{-5}$	$\pm 3,5 \times 10^{-5}$	$< \pm 0,8 \times 10^{-5}$
Drift	$< 3 \times 10^{-5}$	$< 2 \times 10^{-3}$	$\leq 10^{-4}$
Software	KromaSystem 2000 Version 1.83	HP ChemStation 2.01	CLASS-VP 5.032
Sample time / msec (Belichtungszeit)	12 – 99, automatisch optimiert	10	50 – 85, automatisch optimiert
Response time / sec (Registrierintervall)	0,1 - 10	0,1 – 1,3	0,08 – 2,0
Zeitkonstante / sec (über welchen Zeitraum können die Spektren gemittelt werden, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern)	0,1 - 10	0,01 – 2,55	0,24 – 2,0

Für die Untersuchung der Übereinstimmung von UV-Spektren auf Detektoren verschiedener Hersteller wurden jeweils 1 µg Benzol absolut auf Diodenarraydetektoren der folgenden Typen vermessen: Shimadzu SPD-M10Avp, Bio-Tek/Kontron DAD 540 und Hewlett-Packard/Agilent HP 1100. Über letzteren lagen keine näheren Spezifikationen vor. Bei dem in Abb. 17, S. 69 genannten "älteren DAD" handelte es sich um einen Diodenarraydetektor vom Typ Shimadzu SPD-6A.

Die Benzolspektren aus Abb. 16, S. 69, wurden aus den Messungen der Kontrolllösung (s. Abschnitt 3.2.3) gewonnen.

3.3.4 Präzision und Richtigkeit bei der Retentionszeitmessung

Wie bereits in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, wurde vor jeder Messreihe die Totzeit der HPLC-Anlage sowie die absolute Retentionszeit der Retentionszeitstandards MPPH bzw. p-PBP gemessen. Die Retentionszeiten dieser Verbindungen dienten nicht nur zur Berechnung für die RRT der nachfolgend gemessenen Substanzen, sie wurden auch in einer MS-Excel-Tabelle [213] zusammengestellt und hinsichtlich ihrer Streuung über den Messzeitraum ausgewertet. Die Prüfung auf Normalverteilung wurde mit Hilfe des Kolmogoroff-Smirnoff-Verfahrens (s. z. B. [144], S. 41) in SPSS [214] durchgeführt.

Die in Tab. 11, Abschnitt 4.4.2, angegebenen Daten wurden über einen Zeitraum von 28

Monaten (Laufmittel A) bzw. 22 Monaten (Laufmittel B) gesammelt. In dieser Zeit wechselte die Anlage den Standort im Labor und wurde mehrmals umgebaut, Säule (seltener) und Eluent (häufiger) wurden mehrfach ausgetauscht. Messung und Auswertung erfolgten teilweise durch unterschiedliches Personal. Vor diesem Hintergrund können diese Ergebnisse nach [157], S. 49, als laborinterne Vergleichspräzision ("intermediate precision") angesehen werden.

Die Wiederholpräzision ("intra-day precision, repeatability") der absoluten Retentionszeit wurde durch fünfzehn hintereinander ausgeführte Messungen einer Standardlösung mit den Komponenten Histamin, Coffein und MPPH (Konzentrationen wie in Abschnitt 3.2.3) bestimmt, wobei zwischen zwei Messungen immer eine Leerprobe (nur mobile Phase) injiziert wurde, um Verschleppungseffekte auszuschließen. Insgesamt wurde bei einer Analysendauer von hier 20 min ein Zeitraum von 580 min, also mehr als neun Stunden, erfasst.

3.3.5 Präzision und Richtigkeit der Peakflächen

Aus den in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Kontrollmessungen wurde die Peakfläche von Coffein bei 225 ± 5 nm über einen Zeitraum von 28 Monaten erfasst. Aus diesen Daten wurde dann analog zu Abschnitt 3.3.4 die laborinterne Vergleichspräzision berechnet. Coffein wurde auch bei der im gleichen Abschnitt beschriebenen Messreihe zur Wiederholpräzision mitgeführt.

3.4 Prüfung neuer Trennsäulen

Im Vorfeld der Bibliotheksneumessung sollte überprüft werden, ob eventuell neu auf den Markt gekommene Trennsäulen im isokratischen Modus bessere Trennergebnisse als die bis dahin verwendete Säule lieferten. Hierzu wurde an der standardmäßig eingesetzten Lichrospherphase und zusätzlich an drei weiteren Säulen ein Testgemisch aus 23 Substanzen (s. Abschnitt 4.5.2) gemessen. Die Substanzen wurden im Eluenten A gelöst und zunächst einzeln (injizierte Menge: 1 µg) und dann als Gemisch (je 0,4 µg injiziert) auf allen vier Säulen unter Verwendung von Eluent A gemessen. Für zwei der Säulen ("RP8ec" und "Cation Duet", s. u.) wurde die Messung im Eluenten B wiederholt. Neben der Erfassung der (relativen) Retentionszeiten aller Substanzen auf allen Säulen wurden mit Hilfe von in die HPLC-Software (Shimadzu CLASS-VP 5) integrierten Algorithmen jeweils die Peakasymmetrie und die theoretische Trennstufenzahl berechnet. Im folgenden werden die getesteten Säulen, zusammen mit ihren im Ergebnisteil, Abschnitt 4.5.2, benutzten Kurzbezeichnungen, aufgeführt:

"RP8ec": Lichrospher 100-5 RP8ec, 250 x 4 mm, 5 µm Partikeldurchmesser, mit Vorsäule Lichrospher 100 RP8ec, 8 x 4 mm, 5 µm, Füllmaterial von Fa. Merck, Darmstadt, gefüllt von Fa. Macherey & Nagel, Düren, mit ChromCart-Verschraubung. Diese Säule wird – wie oben (Abschnitt 3.1.4) beschrieben - standardmäßig im Rahmen der hier vorgestellten STA-Routine eingesetzt.

"Cation Duet": Hypersil Cation Duet, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Fa. Hypersil, Runcorn, UK.

"ODS-AQ": YMC Pack ODS-AQ, 150 x 3 mm, 3 µm, von Fa. YMC Europe, Schermbeck.

"C18-AQ": Prontosil 120-3-C18-AQ, 150 x 3 mm, 3 μm , von Fa. Bischoff, Leonberg.

Zwischen den Autosampler und die drei letztgenannten Säulen wurde in Ermangelung passender Vorsäulen jeweils eine Filterfritte zum Schutz vor Verstopfung eingebaut. Weitere Spezifikationen der getesteten Säulen sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Kenndaten der verwendeten Säulen.

Säule (Kürzel)	Partikeldurchmesser / μm	Spez. Oberfläche / $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$	Porengröße / \AA	Endcapped
RP8ec	5	350	keine Angabe	ja
Cation Duet ODS (vgl. Abschnitt 4.5.2)	5	170	120	ja
Cation Duet SCX (vgl. Abschnitt 4.5.2)	5	300	100	nein
ODS-AQ	3	300	120	ja
C18-AQ	3	300	120	ja

Für die beiden 5- μm -Säulen wurde eine Flussrate von 1 ml min^{-1} verwendet, für die beiden 3- μm -Säulen wurde mit Rücksicht auf den trotz kürzerer Säulenlänge höheren Rückdruck ein Flow von $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ gewählt. Die Bestimmung der jeweiligen Totzeiten erfolgte in Abhängigkeit vom Säulenmaterial für RP8ec, ODS-AQ und C18-AQ mit Histamin, während für Cation Duet reines H_2O bzw. Acetonitril injiziert wurden (und das gleiche Ergebnis lieferten).

3.5 Einfluss von Störungen des Spektrums auf den Similarity Index

Um zu überprüfen, wie sich niedrige Substanzkonzentrationen oder schlecht kalibrierte Detektoren auf den Similarity Index auswirken, wurde für insgesamt fünf Substanzen mit deutlich unterschiedlichen UV-Spektren (Diphenhydramin, Flunitrazepam, Perazin, Phenobarbital und Prednisolon) das jeweilige Spektrum mit Rauschen überlagert oder um 1 nm langwellig (bathochrom) bzw. kurzwellig (hypsochrom) verschoben.

Die Ausgangsspektren wurden auf das Maximum Eins normiert, dieses lag für Diphenhydramin, Flunitrazepam und Phenobarbital bei 200 nm, für Perazin bei 253 nm und für Prednisolon bei 245 nm. Das Rauschen wurde aus dem "echten" Chromatogramm eines Blutextraktes entnommen, allerdings noch vor dem Lösungsmittelpeak, so dass der Form nach nur das elektronische Rauschen erfasst wurde. Hieraus wurden zwei "Rauschspektren" erhalten: eines (zur Überlagerung der Spektren von Diphenhydramin, Flunitrazepam und Phenobarbital) wurde im Bereich von 200 - 205 nm, das andere (für Perazin und Prednisolon) zwischen 240 und 254 nm auf ein Maximum von Eins und ein Minimum von Null eingestellt.

Analog zum Schätzverfahren für Nachweisgrenze (zwei- bis dreifaches Grundrauschen) und Bestimmungsgrenze (zehnfaches Grundrauschen) nach ICH Richtlinie Q2b [156] wurden dann die Ausgangsspektren im Verhältnis 1:3 bzw. 1:10 mit dem passenden "Rauschspektrum" überlagert. Das resultierende, verrauschte Spektrum wurde dann wieder auf das Maximum Eins normiert. Anschließend wurde in SPSS [214] der Similarity Index zwischen dem ursprünglichen und den veränderten Spektren für alle genannten Substanzen berechnet.

3.6 Berechnung und Auswertung der Ähnlichkeits- bzw. Identifikationsmatrizen

Für die Berechnung der Ähnlichkeitsmatrizen auf der Grundlage der UV-Spektren wurden diese (Wellenlängenbereich 200 - 380 nm) zunächst sämtlich als ASCII-Dateien nach Excel importiert. Es resultierte eine Datenmatrix mit 2.682 Zeilen (Substanzen) und 181 Spalten (Wellenlängen). Für die Berechnung von Ähnlichkeitsmatrizen kleinerer Untergruppen der Bibliothek wurde die entsprechende Datenmatrix aus dieser Ursprungsmatrix entnommen. Die jeweiligen Datenmatrizen wurden als Textdateien gespeichert und nach MatLab [215] importiert, wo dann die Berechnung der Ähnlichkeitsmatrizen auf der Grundlage des Similarity Index (s. Abschnitt 2.2.3) mittels einer selbstgeschriebenen Routine erfolgte, die in Tab. 7 beispielhaft für die Datei "gesa" (alle Spektren der Bibliothek, die in Eluent A gemessen wurden) wiedergegeben wird.

Tab. 7: MatLab-Programmroutine zur Berechnung der Ähnlichkeitsmatrizen.

Programmschritt:	Erläuterung:
load d:\herzler\gesa.txt	Laden der Datenmatrix "gesa"
spek = 1993;	Vorgabe der Anzahl der zu vergleichenden Spektren.
for i = 1:spek	Äußere Programmschleife über alle Spektren: gibt an, <i>welches</i> Spektrum verglichen werden soll.
a = gesa(i,:);	Es wird der Vektor a als i-te Zeile der Datenmatrix "gesa" definiert (Spektrum der Substanz in Zeile i).
for j = 1:spek	Innere Programmschleife über alle Spektren: gibt an, <i>mit welchem</i> Spektrum verglichen werden soll.
b = gesa(j,:);	Es wird der Vektor b als j-te Zeile der Datenmatrix "gesa" definiert (Spektrum der Substanz in Zeile j).
b = b';	b wird in den entsprechenden transponierten Vektor umgewandelt.
c = a*b/(norm(a)*norm(b));	Berechnung des Similarity Index als Skalar c.
res(i,j) = c;	Schreiben des Ergebnisses für c in Zeile i und Spalte j der Ähnlichkeitsmatrix "res".
end	Ende der inneren Schleife (alle j Spektren wurden mit dem i-ten Spektrum verglichen).
i	Anzeigen des aktuellen Wertes von i (Bildschirmkontrolle des Rechenfortschritts).
end	Ende der äußeren Schleife (alle Spektren wurden mit allen verglichen).
save d:\herzler\allea.txt res -ascii -double	Speichern der gesamten Matrix "res" als Datei "allea.txt".
teilmatrix1=res(:,1:250);	Aufteilung der gesamten Ergebnismatrix in Teilmatrizen ("teilmatrix1" bis "teilmatrix8") zu je 250 Spalten (Beschränkung für die Weiterverarbeitung der Daten mit MS Excel, da dort nur Tabellen mit max. 256 Spalten verarbeitet werden können).
teilmatrix2=res(:,251:500);	
teilmatrix3=res(:,501:750);	
teilmatrix4=res(:,751:1000);	
teilmatrix5=res(:,1001:1250);	
teilmatrix6=res(:,1251:1500);	
teilmatrix7=res(:,1501:1750);	
teilmatrix8=res(:,1751:1993);	
save d:\herzler\teila1.txt teilmatrix1 -ascii -double	Speichern der Teilmatrizen "teilmatrix1" bis "teilmatrix8" in die Textdateien "teila1.txt" bis "teila8.txt" ..
:	
save d:\herzler\teila4.txt teilmatrix8 -ascii -double	

Die Ähnlichkeitsmatrizen auf der Basis der spektralen Feinstruktur wurden ebenfalls auf der Grundlage des Similarity Index mit SPSS ([214], Modul KORREL) berechnet. Die Häufigkeitsauszählungen (unterscheidbare / nicht unterscheidbare Substanzpaare) wurden in Microsoft Excel [213] jeweils für die drei Schwellenwerte $SI \geq 0,990$, $SI \geq 0,995$ und $SI > 0,9990$ (vgl. Abschnitt 4.5.4) durchgeführt.

Die direkte Berechnung aller Identifikationsmatrizen auf der Grundlage der RRT, die sowohl für das 1s- als auch für das 2s-Fenster (68,3 % - bzw. 95,4 % - Vertrauensbereich) durchgeführt wurde, erfolgte in MS Excel [213].

Die in Abschnitt 4.5.5 beschriebene Kombination der Identifikationsmatrizen erfolgte ebenso wie die anschließenden Häufigkeitsauszählungen in MS Excel [213]. Es wurden alle Kombinationen (drei verschiedene Schwellenwerte für die Spektren, zwei verschieden große RRT-Fenster) ausgezählt.

Die Berechnung von IP, RIP, DP, MLL und XM erfolgte ebenfalls in MS Excel [213].

3.7 Spektroskopische Variabilität

Parallel zur Erfassung der Chromophore in der Chromophorendatenbank und in der Strukturdatenbank (vgl. Abschnitt 3.2.5) wurde eine Tabelle in MS Excel [213] mitgeführt, die eine bequeme Auszählung der Chromophore bzw. Absorptionssysteme ermöglichte (Ergebnisse s. Abschnitt 4.6).

3.8 Durchführung der Clusteranalysen

Die Durchführung der Clusteranalysen erfolgte mit SPSS [214] unter Verwendung der Methode "Hierarchische Cluster". Als Cluster-Methode wurde das Ward-Verfahren gewählt, als Ähnlichkeitsmaß der "Kosinus" (entspricht dem Similarity Index).

3.9 Durchführung der Diskriminanzanalysen

Die Durchführung der Diskriminanzanalysen erfolgte mit SPSS [214]. Es wurde ausschließlich das Verfahren der schrittweisen Diskriminanzanalyse eingesetzt (Einstellung "Schrittweise Methode verwenden"). Als Methode wurde "Wilks' Lambda" mit folgenden Kriterien gewählt: "F-Wahrscheinlichkeit verwenden - Aufnahme: ,05 - Ausschluss: ,10". Zu Beginn jeder Rechnung wurde immer Box' M-Test durchgeführt: ergab sich Varianzeninhomogenität, erfolgte die SDA auf der Basis gruppenspezifischer Kovarianzmatrizen, im gegenteiligen Fall wurde die Einstellung "Kovarianzmatrix verwenden - Innerhalb der Gruppen" gewählt (vgl. Abschnitt 2.5.5).

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Spektrenbibliothek und Datenbanken

4.1.1 Auswahl der Substanzen / Toxikologische Relevanz

Die Spektrenbibliothek enthält Vertreter aller von Müller et al. [19] als relevant bezeichneten Wirkstoffgruppen, sowie darüber hinaus illegale Drogen und endogene Stoffe ebenso wie umwelttoxikologisch (PCB, PAK) und arbeitstoxikologisch (Lösungsmittel) bedeutsame Substanzen. Des weiteren wurden zahlreiche Metabolite aufgenommen. Einen Überblick über die Vielfalt der in die Spektrenbibliothek aufgenommenen Substanzen gibt die Einteilung nach Wirkung bzw. Anwendungsgebiet der Wirkstoffe in zwölf Teilbibliotheken, die als Hilfe für Anwender mit analytischen Spezialgebieten der kommerziellen Version beigelegt wurde und die in Tab. 8 aufgeführt ist.

Tab. 8: Zuordnung der für die Spektrenbibliothek gemessenen Substanzen zu Untergruppen auf der Basis ihrer Wirkung bzw. des Hauptanwendungsgebietes.

Name der Unterbibliothek	Anzahl der Substanzen	Beschreibung
TOX01	218	Substanzen mit Suchtpotenzial, illegale Drogen, psychoaktive Verbindungen, Hypnotika
TOX02	299	Psychopharmaka, Antiepileptika und Substanzen mit ähnlichem Wirkspektrum
TOX03	220	Analgetika, Antirheumatika, Antitussiva und Substanzen mit ähnlichem Wirkspektrum
TOX04	150	Antihistaminika, Antiallergika, weitere ZNS-aktive Substanzen mit unterschiedlicher Wirkung
TOX05	240	Substanzen mit kardiovaskulärer Wirkung
TOX06	189	Diuretika, Stoffe mit Wirkung auf das Gerinnungssystem, Substanzen mit Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt, weitere mit verschiedener Wirkung
TOX07	262	Wirkstoffe mit Steroidstruktur, Hormone, endogene Substanzen, Vitamine
TOX08	287	Zytostatika, antimikrobielle Wirkstoffe, Substanzen mit Wirkung auf das Immunsystem
TOX09	240	Fungizide, Desinfektionsmittel, Hilfsstoffe, Diagnostika
TOX10	264	Insektizide, Akarizide, Nematizide und vergleichbare Pestizide
TOX11	196	Herbizide
TOX12	117	Ökotoxische Substanzen

Eine verbindliche, vollständige Liste toxikologisch relevanter Substanzen existiert nicht. Es ist aber ein Abgleich mit der Literatur möglich. Für den klinisch-toxikologischen Bereich wurde dieser mit den Arbeiten von Schulz und Schmoldt [207] bzw. Regenthal et al. [206] durchgeführt. Es handelte sich dabei um Zusammenstellungen jeweils mehrerer hundert therapeutischer, toxischer, sowie komatös-letaler Wirkstoffspiegel für die klinische Notfalldiagnostik. UV-inaktive Wirkstoffe wurden im Rahmen des Abgleichs als der HPLC-DAD nicht zugänglich gewertet, gesondert aufgeführte Metabolite, deren Muttersubstanz in der Bibliothek enthalten war, dagegen als zugänglich. Insgesamt waren von 721 in [206] aufgeführten Substanzen 661 (91,7 %) und von 574 in [207] genannten Wirkstoffen 528 (92,0 %) in der Spektrenbibliothek vertreten. Die meisten nicht erfassten Substanzen wären über ihre UV-Spektren zumindest der HPLC-DAD zugänglich gewesen und sollen in künftige Aktualisierungen der Bibliothek

aufgenommen werden. Als Ergebnis kann festgehalten werden, dass der Kreis der unstrittig toxikologisch relevanten Substanzen durch die Spektrenbibliothek gut abgedeckt wird.

Ein weiteres Kriterium für toxikologische Relevanz stellt die Häufigkeit des Auffindens der betreffenden Substanz im Analysengut dar. Hierzu wurden die Ein- und Ausgangsbücher der Abteilung Toxikologische Chemie des Instituts für Rechtsmedizin der Berliner Charité über einen Zeitraum von fünf Jahren (vom 1.1.1997 - 31.12.2001) im Hinblick auf die Frage ausgewertet, welche Wirkstoffe mit welcher Häufigkeit im Untersuchungsgut aufgetreten waren. Berücksichtigt wurden neben General-Unknown-Analysen bei unklaren Todesfällen ("Toxfälle") und akuten Notfällen aus der Rettungsstelle des Universitätsklinikums Charité auch Spiegelbestimmungen im Rahmen der Compliance- und Therapiekontrolle ("Therapeutic Drug Monitoring" (TDM), beide zusammen: "Klinikfälle"). Neben den tatsächlich gefundenen Wirkstoffen wurden dabei auch solche gezählt, deren Vorhandensein nur vermutet, jedoch nicht nachgewiesen worden war. Verschiedenartige Proben (z. B. Serum und Organprobe) aus dem selben Fall wurden ebenso einzeln gezählt wie zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommene Blutproben des-/derselben Patienten/-in. General-Unknown-Analysen ohne positiven Befund wurden nicht mitgezählt. Für die Aufnahme in die Zählung war nicht entscheidend, ob die betreffende Substanz in der gefundenen Konzentration geeignet war, tatsächlich einen gesundheitlichen Schaden oder sogar den Tod zu verursachen. Ebenfalls unerheblich war die Frage, ob sie tatsächlich mit GC-MS oder mit HPLC-DAD nachgewiesen worden war.

Die Auswertung der Ein- und Ausgangsbücher schloss insgesamt 11.234 analysierte Proben ein, davon 8.845 Klinik- und 2.389 Toxfälle. Insgesamt wurden im fraglichen Zeitpunkt 311 verschiedene Wirkstoffe gezählt. Gefundene Metabolite wurden dabei der Muttersubstanz zugerechnet, so dass tatsächlich deutlich mehr Verbindungen zu bestimmen waren. Nicht mitgezählt wurden Coffein, das fast immer gefunden wurde, aber i. d. R. irrelevant war, und Ethanol, da die Blutalkoholbestimmung getrennt erfolgt. Eine Übersicht über die Häufigkeit der gefundenen Wirkstoffe gibt Abb. 12.

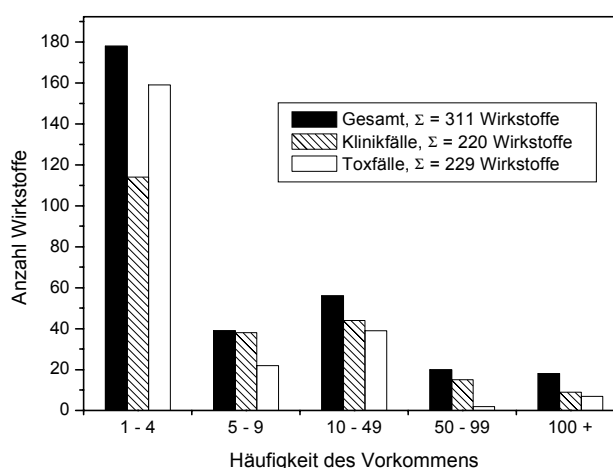


Abb. 12: Häufigkeit des Vorkommens von Wirkstoffen im Analysengut der Abt. Toxikologische Chemie des Instituts für Rechtsmedizin der HU Berlin in den Jahren 1997-2001. "Klinikfälle": Notfalltoxikologie für die Rettungsstelle der Berliner Charité und Bestimmung von Medikamentenspiegeln im Rahmen von Compliance und – Therapiekontrolle (TDM) für einzelne Stationen, "Toxfälle": Untersuchungen im Auftrag der Staatsanwaltschaft bei unklaren Todesfällen. Die Gesamtzahlen sind kleiner als die Summe von Klinik- und Toxfällen, da ein gewisser Anteil der Wirkstoffe in beiden Gruppen enthalten war.

Während insgesamt knapp 40 Verbindungen im betrachteten Fünfjahreszeitraum fünfzigmal oder häufiger gefunden wurden, traten - sowohl getrennt nach "Klinik-" und "Toxfällen" als auch insgesamt - jeweils mehr als die Hälfte der Wirkstoffe in fünf Jahren höchstens viermal auf. Dies unterstreicht einmal mehr, dass eine STA-Strategie sich auch jederzeit auf scheinbar unwahrscheinliche oder für überholt gehaltene Substanzen einstellen muss (so wurden z. B. bei zwei Toxfällen die bereits seit längerer Zeit nicht mehr zugelassenen Barbiturate Cyclobarbitol und Amobarbital nachgewiesen). Die fünfzig insgesamt am häufigsten gefundenen Substanzen sind in Tab. 9 aufgeführt. Auch die in dieser Tabelle an letzter Stelle aufgeführten Wirkstoffe waren noch im Schnitt mehr als siebenmal pro Jahr zu bestimmen.

Tab. 9: Übersicht über die fünfzig bei der Durchsicht der Ein- und Ausgangsbücher aus den Jahren 1997 – 2001 am häufigsten gefundenen Wirkstoffe.

Wirkstoff	Summe	Klinikfälle	Toxfälle	Wirkstoff	Summe	Klinikfälle	Toxfälle
Clozapin ¹	2204	2199	5	Sotalol ¹	66	65	1
Amiodaron ¹	2139	2135	4	Trimethoprim	66	57	9
Itraconazol ¹	705	704	1	Phenytoin	66	55	11
Diazepam	549	370	179	Temazepam	66	47	19
Carbamazepin	273	238	35	Sertindol ¹	60	60	0
Amitriptylin	272	244	28	Clonazepam ¹	58	58	0
Lamotrigin ¹	218	215	3	Clomethiazol	57	48	9
Morphin	206	17	189	Quetiapin ¹	55	55	0
Perazin ¹	158	149	9	Sulfamethoxazol	54	41	13
Midazolam	155	92	63	Imipramin ¹	53	52	1
Cocain	150	21	129	Phenobarbital	53	39	14
Codein	149	11	138	Amphetamin	52	19	33
Lidocain	146	24	122	Oxazepam	50	31	19
Cannabis	126	12	114	Clomipramin	48	44	4
Methadon	122	42	80	Noscapin	44	6	38
Propafenon ¹	119	119	0	Fluconazol ¹	43	40	3
Heroin/MAM	118	9	109	Trimipramin	43	26	17
Paracetamol	115	86	29	Zolpidem	42	31	11
Metamizol	96	50	46	Metoprolol	41	34	7
Oxcarbazepin ¹	95	95	0	Glibenclamid	38	37	1
Thiopental	89	56	33	Fluoxetin	37	33	4
Doxepin	86	58	28	Citalopram	37	30	7
Salicylsäure / Salicylamid	74	55	19	Nitrazepam	37	30	7
Venlafaxin ¹	72	70	2	Pentobarbital	36	21	15
Diphenhydramin	72	45	27	Digoxin/Digitoxin	36	0	36

¹ Die Bestimmung erfolgte ausschließlich oder in der weitaus überwiegenden Anzahl der Fälle im Rahmen des TDM.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Gesamtliste ebenso wie diejenige der Klinikfälle von den

drei vor allem im Rahmen des Therapeutic Drug Monitoring (TDM) besonders häufig angeforderten Wirkstoffen Clozapin (Neuroleptikum), Amiodaron (Antiarrhythmikum) und Itracozazol (Antimykotikum) dominiert wird. Alle drei Substanzen wurden jedoch in geringem Umfang auch bei Toxfällen gefunden (fünf-, vier- bzw. einmal in fünf Jahren). Weitere wichtige Substanzklassen, auch bei Notfällen, waren Neuroleptika, Tranquilizer, Antidepressiva und Antiepileptika. Dies überrascht wenig, wenn man bedenkt, dass suizidgefährdete Patienten oft mit diesen Medikamentengruppen behandelt werden; sie sind demzufolge bei einem Suizidversuch für die Patienten leicht verfügbar. Bei den Toxfällen dominierten erwartungsgemäß die illegalen Drogen, des weiteren spielten Hypnotika/Tranquilizer und Analgetika eine wichtige Rolle.

Eine Untersuchung weiterer, die toxikologische Relevanz betreffender Aspekte, wie der Verbreitung, Giftigkeit, Zugänglichkeit, Bekanntheit etc. der in der Bibliothek enthaltenen Substanzen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Wie aus den vorstehend genannten Zahlen ersichtlich ist, sind diese Kriterien auch nur bedingt geeignet, die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einzelner Wirkstoffe im Analysengut vorherzusagen.

4.1.2 Die Spektrenbibliothek

Es wurde bereits in der Einleitung zur vorliegenden Arbeit angesprochen, dass eine Referenzdatensammlung für die Systematische Toxikologische Analyse nicht nur bezüglich des Substanzbestandes, sondern auch im Hinblick auf den neuesten Stand der Messtechnik ständig aktuell gehalten werden muss. Als für die Vorläuferversion der Spektrenbibliothek eine umfangreichere Substanzaktualisierung anstand und gleichzeitig ein modernerer Diodenarray-detektor verfügbar war, fiel daher die Entscheidung für eine vollständige Neumessung der gesamten Bibliothek. Die Qualitätsunterschiede zwischen den früher gemessenen und den aktuellen UV-Spektren werden in Abb. 13 am Beispiel des Methabenzthiazurons verdeutlicht.

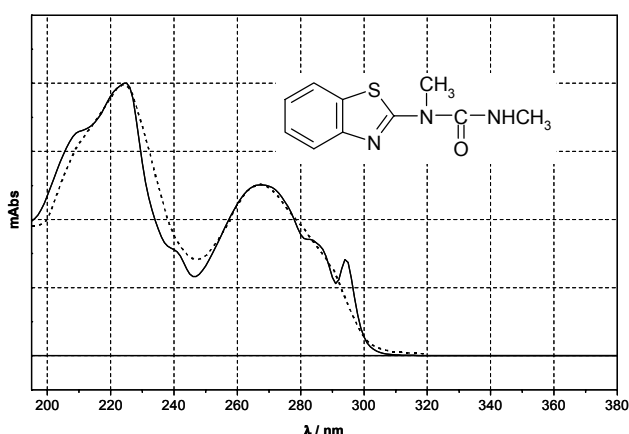


Abb. 13: Vergleich der Spektren von Methabenzthiazuron bei unterschiedlich guter spektraler Auflösung: die Abbildung zeigt die beiden Spektren aus der älteren Vorläuferversion (gepunktete Linie) und der neu gemessenen Version der Spektrenbibliothek (durchgezogene Linie). Der Gewinn an spektraler Information ist deutlich sichtbar.

Die Spektrenbibliothek [7] enthält 2.682 UV-Spektren toxikologisch relevanter Substanzen. Die Spektren wurden unter einheitlichen Bedingungen (s. Abschnitt 3.2.4) im Bereich von 195 –

380 nm mit einer Schrittweite von 1 nm aufgenommen, so dass jeweils 186 Wellenlängen-Extinktions-Paare erhalten wurden. In der Praxis wird jedoch meist nur der Bereich von 200-380 nm verwendet (181 Wertepaare), um Lösungsmittel- und Matrixeinflüsse gering zu halten. Aufgrund teilweise erforderlicher Wiederholungsmessungen wurden für die Erstellung der Spektrenbibliothek grob geschätzt annähernd 4.000 Einzelmessungen durchgeführt. Mit in die Bibliothek aufgenommen wurden auch die Daten von 206 Substanzen, die keine UV-Absorption im untersuchten Wellenlängenbereich zeigten.

In der kommerziellen Version wurde die Bibliothek als Buch + CD-ROM herausgegeben. Das Buch (1042 S., in englischer Sprache) enthält für alle Wirkstoffe neben dem UV-Spektrum und der Strukturformel einen Datensatz (vgl. Abschnitt 3.2.2) mit INN bzw. IUPAC-Namen, interner Codenummer, CAS-Nummer, zugehöriger Unterbibliothek, Angaben zur Wirkung bzw. zum Anwendungsgebiet, spektralen Maxima, Minima und Schultern sowie der RRT (s. Abb. 14).

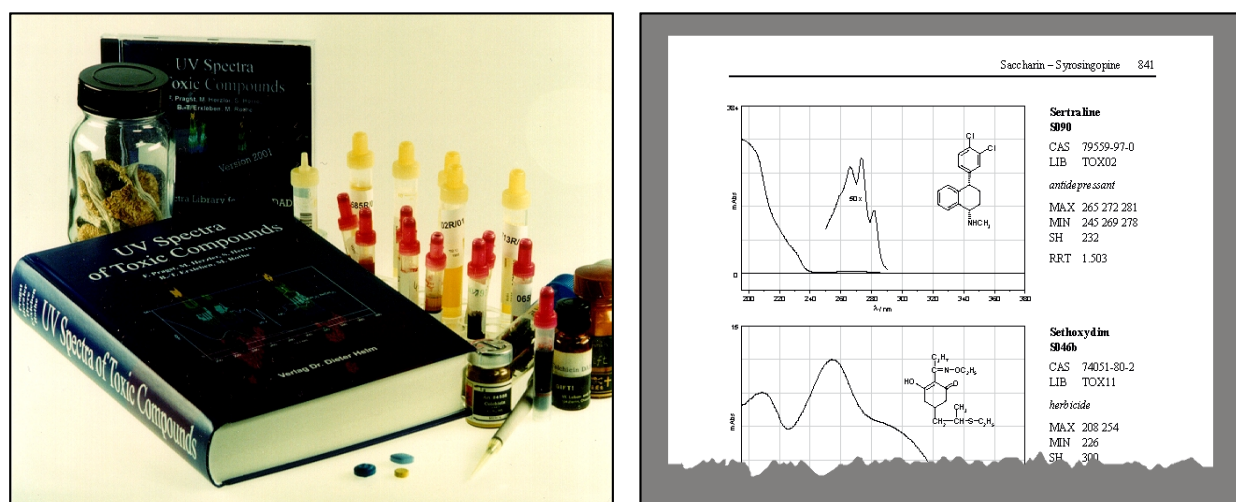


Abb. 14: Abbildungen der Spektrenbibliothek. Links: Buch + CD-ROM, rechts: Bibliothekseintrag aus dem Buch (Ausriss) mit Spektrum, Strukturformel und zugehörigem Datensatz.

Eine 50-seitige Einleitung erläutert die Grundlagen des Verfahrens und den Aufbau der Bibliothek und verweist auf weiterführende Literatur. Indizes erleichtern die Suche nach einem bestimmten Wirkstoff anhand des Namens, der Codenummer oder der CAS-Nummer.

Die CD-ROM enthält sämtliche UV-Spektren wahlweise im Format der EZChrom-Software (Scientific Software Inc, Pleasanton, USA), die der HPLC-DAD-Software von Herstellern wie Shimadzu oder ThermoFinnigan zugrunde liegt, oder im HP-ChemStation-Format (Fa. Agilent). Für Nutzer von HPLC-Programmen anderer Hersteller werden alle Spektren zusätzlich im ASCII-Format mitgeliefert, das i. d. R. in die betreffende Software importierbar sein sollte.

Zusätzlich sind auf der CD-ROM sämtliche im Buch enthaltenen Daten (mit Ausnahme der Strukturformel) in einer Datentabelle zusammengefasst (Formate: MS Access und dBase).

Weiterhin sind (im EZChrom-Format) mehrere Sätze von Bibliotheksdateien enthalten, in denen neben dem Spektrum auch Codenummer, INN bzw. IUPAC-Name und RRT tabelliert sind. Neben der oben (Abschnitt 4.1.1) beschriebenen Einteilung nach der Wirkung (zwölf Unter-

bibliotheken) gibt es noch nach dem Anfangsbuchstaben (26 Bibliotheken) oder nach der RRT (zwölf für Laufmittel A, drei für Laufmittel B) sortierte Bibliotheken. Alle Bibliotheksdateien können direkt für die Bibliothekssuche (vgl. Abschnitt 2.2.4) genutzt werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte Bibliothek stellt nach Kenntnis des Autors die weltweit größte UV-Spektrenbibliothek für die HPLC-DAD dar.

4.1.3 Datenbanken

Während der Messung der Spektrenbibliothek wurden mit Hilfe der chemischen Datenbanksoftware Isis Base [212] zwei Datenbanken (vgl. Abschnitt 3.2.5) aufgebaut. In der "Substanzdatenbank" (Abb. 15) wurden die Strukturformel und zahlreiche Substanzdaten aller 2.888 Substanzen (UV-aktive + UV-inaktive) der Spektrenbibliothek erfasst.

ISIS/Base - [DATENBANK.DB/neu]

File Edit Options Object Database Search List Window Help

Forms Query Browse Update

<Root> 10 of 2888

Search Domain: All

↑

↑

#

↓

↓

DB

Menu

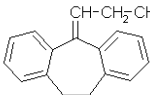
Name		Amitriptyline		Max 1 / nm 205	Min 1 / nm 229	
Code	<div></div>			Max 2 / nm 238	Min 2 / nm	
A019						
CAS_No				50-48-6	Max 3 / nm	Min 3 / nm
RRT				1.204	Max 4 / nm	Min 4 / nm
Korr_RRT				1.242	Sch 1 / nm	Sch 2 / nm
Molmasse				277.4130	Sch 3 / nm	Spek_Seite 97
Summenformel	C ₂₀ H ₂₃ N	Bemerkung				
Area_10E6		Sortier	Wirkung	Fläche Kontron		
2.959		134	antidepressant	47.982		
Chromophor1	Chromophor2	Chromophor3	Chromophor4	Chromophor5	Chromophor6	
11						
IUPAC Name						
N-[3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d][7]annulen-5-ylidene)propyl]-N,N-dimethylamine						

Abb. 15: Bildschirmansicht der "Substanzdatenbank".

Die verwendete Software eröffnet vielseitige Recherchemöglichkeiten: der Datenbestand kann nach chemischen Teilstrukturen (auch mit Platzhaltern, um mehrere Teilstrukturen auf einmal zu finden), nach spektroskopischen Extrema oder Schultern, nach RRT, Wirkung oder enthaltenen Chromophoren durchsucht werden. Für die numerischen Felder sind auch Bereichssuchen möglich ("alle Substanzen mit einer RRT zwischen 0,5 und 0,7"). Über einen Abfrageeditor ("Query Builder") können mehrere Felder gleichzeitig durchsucht werden ("alle Substanzen mit Steroidgerüst, einem spektroskopischen Maximum zwischen 230 und 250 und einer RRT im Laufmittel B zwischen 1,1 und 1,5"). Als Ergebnis werden Substanzlisten erhalten, die über Boolesche Operatoren beliebig miteinander verknüpft werden können (z. B. "alle Substanzen, die in Liste A UND Liste B, aber NICHT in Liste C enthalten sind"). Ergebnislisten können bequem nach MS Excel [213] exportiert werden, umgekehrt ist ein schneller Import großer

Datenmengen in einem Schritt möglich. Die Software generiert selbständig Summenformel und Molmasse der eingegebenen Struktur, über eine Erweiterung (Plug-In "Autonom") kann der systematische IUPAC-Name generiert werden.

Die Substanzdatenbank stellt ein neues, wichtiges Hilfsmittel für die toxikologische Analyse mittels HPLC-DAD dar. Ihre Anwendungsmöglichkeiten sind vielfältig, hier seien nur einige genannt:

- Im Falle eines gerichteten Untersuchungsauftrages sind über den Wirkstoffnamen mit einem Mausklick alle relevanten Substanzdaten verfügbar, anhand der RRT kann die geeignete mobile Phase, anhand der spektroskopischen Daten eine passende Wellenlänge für die Quantifizierung ausgewählt werden.
- Bei weiteren Aktualisierungen der Spektrenbibliothek können zum Zweck der Plausibilitätskontrolle über die Strukturformel der neu zu messenden Verbindung bereits in der Bibliothek enthaltene Wirkstoffe mit ähnlichem Chromophor herausgesucht werden (dies wurde auch schon in der Aufbauphase der Bibliotheksneufassung so gehandhabt).
- Wird im Rahmen einer ungerichteten Suchanalyse ein zunächst nicht identifizierbares Spektrum gefunden, so können bekannte Substanzen mit ähnlichen spektroskopischen Extrema aus dem Datenbestand herausgesucht werden.
- Über die Chromophorennummer(n) kann zu einer Substanz schnell eine Liste der in der Bibliothek vorhandenen zugehörigen Metabolite mit unverändertem Chromophor erhalten werden.
- Für die Forschung am Datenbestand können schnell Listen von Vertretern bestimmter struktureller Gruppen zusammengestellt werden.

Wünschenswert wäre sicherlich eine Integrationsmöglichkeit für vollständige UV-Spektren gewesen, diese war softwareseitig jedoch nicht vorgesehen. Immerhin wird in der Substanzdatenbank für jeden Eintrag auf die entsprechende Seite im Buch verwiesen, so dass das zugehörige Spektrum schnell - wenn auch nicht in maschinell lesbarer Form - zur Verfügung steht. Heller [216] beschreibt eine chemische Datenbanksoftware, die chemisches Formelzeichnen mit Spektrenverwaltung (NMR, IR, MS) verbindet ("Chemograph Plus"), aber derzeit noch in der Entwicklungsphase zu stehen scheint. Williams et al. [217] berichten über ein Chromatographiesoftware mit integriertem Strukturformelmanagement.

Zusätzlich zur Substanzdatenbank wurde eine Chromophorendatenbank aufgebaut, für die sämtliche in der Bibliothek enthaltene Chromophore (1.486) mitsamt Struktur ermittelt, benannt, nummeriert und mit der Häufigkeit ihres Vorkommens alleine sowie in Kombination mit anderen Chromophoren erfasst wurden. Diese Datenbank wurde vornehmlich als Grundlage für die im Abschnitt 4.6 vorgestellten Ergebnisse genutzt. Sie kann aber ebenfalls dazu dienen, bei einem neuen Analysenauftrag schnell herauszufinden, ob Substanzen mit dem entsprechenden Chromophor bereits in der Datenbank vorhanden sind.

4.2 Anforderungen an die Validierung von Messverfahren für die STA

4.2.1 Einführung

Detaillierte Überlegungen zur Validierung analytischer Messverfahren für die Systematische Toxikologische Analyse sind nach Kenntnis des Verfassers bislang nicht publiziert worden. Langfristig wäre es auf jeden Fall wünschenswert, dass auch für die STA allgemeingültige Richtlinien durch anerkannte Gremien der Fachverbände (also in diesem Fall beispielsweise durch den Arbeitskreis Qualitätssicherung der GTFCh) publiziert würden. Bis es soweit ist, besteht zweifelsohne noch erheblicher Diskussionsbedarf, insbesondere hinsichtlich der in den Abschnitten 4.3 bis 4.7 vorgestellten methodischen Kenngrößen und ihrer Bestimmung, die sicherlich immer auch auf das jeweils untersuchte Messverfahren zugeschnitten sein müssen. Daher sollen hier zunächst grundsätzliche Gedanken zu diesem Thema vorgestellt werden, die als eine erste Diskussionsgrundlage zu verstehen sind.

Wesentliches Merkmal einer Validierung ist immer der Bezug auf die zugrundeliegende analytische Aufgabenstellung. In der oben (Abschnitt 2.3.1) beschriebenen Einteilung der Validierung in vier Stufen nach Kromidas [157] besteht daher der erste Schritt in der Beschreibung der Anforderungen an das zu validierende Messverfahren. Formuliert man die von de Zeeuw ([11], s. Abschnitt 2.1.1) genannten allgemeinen Ansprüche an eine STA-Analysenmethode im Detail, so lassen sich zwei Bereiche unterscheiden: Anforderungen an die Identifizierung einerseits und an die Quantifizierung andererseits. Diese werden in den beiden folgenden Abschnitten näher betrachtet. Es erschien dabei praktischer, von der Einteilung nach Kromidas etwas abzuweichen und die Auswahl geeigneter Verfahrenskenngrößen hier miteinzubeziehen. Ein weiteres Problemfeld betrifft Art und Umfang des unbedingt zu erfassenden Substanzkreises (Themenkomplex "toxikologische Relevanz"). Gedanken hierzu finden sich an mehreren Stellen der vorliegenden Arbeit. Die weiter oben geschilderte Idee einer Substanzliste ähnlich der Dopingliste des IOC [19] erscheint hier ein sinnvoller Weg zu sein, eine abschließende Festlegung im Rahmen der vorliegenden Arbeit erschien jedoch vermessen.

Der Rest der zweiten Stufe und die dritte Stufe, die tatsächliche Bestimmung der Verfahrensmerkmale für die HPLC-DAD sowie die Diskussion der Ergebnisse vor dem Hintergrund der entwickelten Anforderungen, finden sich in den Abschnitten 4.3 bis 4.7. Der letzte Schritt, die abschließende Betrachtung der Eignung des vorgestellten HPLC-DAD-Verfahrens für die STA, wird in Abschnitt 6 vorgenommen.

4.2.2 Anforderungen an die Substanzidentifizierung im Rahmen der STA

Die Anforderungen an die Substanzidentifizierung lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: möglichst viele relevante Wirkstoffe sollen mit hoher Identifikationsstärke und -sicherheit erfasst werden. Im Detail bedeutet dies:

- Die Methode muss hochselektiv sein (vgl. Abschnitt 2.3.3). Voraussetzung hierfür ist, dass durch das Verfahren die Abfrage von Messgrößen mit einem hohen Maß an Spezifität zur Substanzidentifizierung benutzt wird. Sofern keine einhundertprozentige Selektivität herzu-

stellen ist (dies dürfte der Regelfall sein), sollte für jede Substanz bekannt sein, welche anderen Verbindungen potentiell die Identifizierung beeinträchtigen können.

- Im Falle einer nicht zu beseitigenden Signalüberlagerung sollte im Rahmen eines STA-Gesamtkonzeptes die Möglichkeit zu einer klärenden Wiederholungsmessung unter veränderten Bedingungen oder mittels eines zweiten Messverfahrens zur Verfügung stehen.
- Diejenigen analytischen Messgrößen, über die eine Substanz identifiziert wird, müssen mit bekannter und hinreichender Genauigkeit gemessen werden.
- Bei der Arbeit mit Referenzdatensammlungen / Spektrenbibliotheken müssen diese Referenzdaten ebenfalls mit bekannter und hinreichender Genauigkeit gemessen worden sein.
- Die Nachweisgrenzen sollten maximal im unteren Bereich des jeweils relevanten Konzentrationsbereiches liegen, da die Substanz sonst auch qualitativ nicht erfasst werden kann. Dabei kann sich dieser Konzentrationsbereich je nach Anforderung unterscheiden: während zum Nachweis bzw. zum Ausschluss einer Vergiftung vor allem der Bereich toxischer Wirkspiegel von Interesse ist, mag in anderen Fällen ein Nachweis im unteren therapeutischen Bereich gefordert sein (bei ungeklärten Todesfällen beispielsweise, um die Einnahme lebensnotwendiger Medikamente zu belegen).

Aus dieser Aufzählung ergeben sich folgende Verfahrenskenngrößen, die im Rahmen der Validierung eines analytischen Messverfahrens für die STA angegeben werden sollten: Genauigkeit, also Präzision und Richtigkeit für Referenzdaten und die Messung der Proben, Spezifität der verwendeten Messgrößen, Selektivität des Verfahrens, Nachweisgrenzen.

4.2.3 Anforderungen an die Quantifizierung im Rahmen der STA

An eine quantitative Substanzbestimmung sind die folgenden Ansprüche zu stellen:

- Sie sollte mit hinreichender Genauigkeit erfolgen.
- Die Bestimmungsgrenzen sollten maximal im unteren Bereich des jeweils relevanten Konzentrationsbereiches (s. o.) liegen.
- Sofern nicht chemisch gleichartige Standards zur Verfügung stehen, müssen die Wiederfindungsraten bekannt sein.
- Die zu messenden Substanzen sollten unter den Bedingungen des Analysenverfahrens stabil sein.

Zusätzlich zu den in Abschnitt 4.2.2 genannten Kenngrößen wären also bei der quantitativen Bestimmung Genauigkeit, Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungsraten anzugeben.

4.3 Matrixeinflüsse

Ein grundsätzliches Problem bei der Validierung von Analysenverfahren für biologische Proben stellt die Matrix dar, deren Zusammensetzung und damit auch deren Gehalt an Störsubstanzen sich von Probe zu Probe stark unterscheidet und im voraus grundsätzlich unbekannt ist. In Tab. 10 ist dargestellt, inwiefern die Matrix für die Methodenvalidierung wichtige Kenngrößen

negativ beeinflussen kann.

Die Frage, inwieweit diese Probleme bei der Validierung berücksichtigt werden können, wird in den folgenden Abschnitten bei der Behandlung der jeweiligen Kenngrößen mitbetrachtet.

Tab. 10: Einflüsse einer starken Belastung der Probenmatrix mit Störsubstanzen auf verschiedene, für die Methodenvalidierung wichtige Kenngrößen.

Messgröße	Methodenkenngröße	Beeinflussung durch die Probenmatrix
RT / RRT	Genauigkeit	Nur bei stark (und daher erkennbar) überlagerten Signalen Verschiebung, also eher unproblematisch.
	Selektivität	Da sich seriöse Angaben zur Selektivität nur auf einen bekannten Substanzbestand beziehen können, kann die Störung durch Signale unbekannter Substanzen nicht erfasst werden.
UV-Spektrum	Selektivität	Da sich seriöse Angaben zur Selektivität nur auf einen bekannten Substanzbestand beziehen können, kann die Störung durch Signale unbekannter Substanzen nicht erfasst werden. Stark überlagerte Peaks werden durch Peakreinheitsprüfung entdeckt. Schwach überlagerte Peaks stellen das größere Problem dar: das Spektrum wird leicht verändert, so dass bei einer Bibliothekssuche kleinere Ähnlichkeitsindizes (SI) resultieren, die u. U. die als Kriterium für eine Identifikation festgelegten Schwellenwerte unterschreiten.
	Nachweisgrenze	Bei einer hochbelasteten Matrix wird die Nachweisgrenze z. T. deutlich heraufgesetzt, da Peaks bei kleinen Substanzkonzentrationen nicht mehr gesehen werden.
	Bestimmungsgrenze	Bei einer hochbelasteten Matrix wird die Bestimmungsgrenze z. T. deutlich heraufgesetzt, da Peaks bei kleinen Substanzkonzentrationen nicht mehr gesehen werden.
Peakfläche	Genauigkeit	Ein starker Matrixuntergrund führt zu größerer Schwankung bei kleinen Substanzkonzentrationen.
	Wiederfindung	Wird insofern beeinflusst, als dass sich bei der Extraktion aus stark belasteten Matrices (z. B. besonders fetthaltig) u. U. der Verteilungskoeffizient zuungunsten der organischen Phase verändern könnte.
	Bestimmungsgrenze	Bei einer hochbelasteten Matrix wird die Bestimmungsgrenze z. T. deutlich heraufgesetzt, da Peaks bei kleinen Substanzkonzentrationen nicht mehr gesehen werden.

4.4 Genauigkeit bei der Identifizierung

4.4.1 Genauigkeit der UV-Spektren

Ein UV-Spektrum kann prinzipiell in zwei Dimensionen fehlerbehaftet sein: das Spektrum kann wellenlängenverschoben sein, und die Extinktionen auf den verschiedenen Wellenlängen können relativ zueinander schwanken. Ein weiteres Problem stellen Abweichungen zwischen Spektren dar, die mit unterschiedlicher spektraler Auflösung gemessen wurden (vgl. Abb. 13, S. 62, dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht).

Die Wellenlängengenauigkeit der Spektren wurde geräteseitig durch eine Wellenlängenkali-brierung sichergestellt. Im Falle des Shimadzu SPD-M10Avp wurden hierfür zwei Bezugs-systeme eingesetzt: zwei charakteristische scharfe Peaks im Spektrum der eingebauten D₂-Lampe (486,0 bzw. 656,1 nm) einerseits und zwei weitere charakteristische Peaks im Spektrum des in den Strahlengang einschiebbaren Holmium-Filters (287,6 bzw. 360,8 nm) andererseits. Diese technisch nicht beeinflussbaren Richtwerte können als zertifizierten Referenzmaterialien gleichwertig angesehen werden. Wurde in der HPLC-Software eine an die Wellenlängenkali-

brierung anschließende Genauigkeitsüberprüfung durchgeführt, so wurden Abweichungen von nicht mehr als 0,1 nm gefunden. Damit steht die Richtigkeit der gemessenen Spektren innerhalb der herstellerseitig angegebenen effektiven spektralen Auflösung (vgl. Tab. 5, Abschnitt 3.3.3) außer Frage. Aus Abb. 16 wird deutlich, dass sich die Lage des Spektrums bei Messung am selben Gerät auch in kleinen Details nach einer Wellenlängenkalibrierung über Monate hinweg nicht änderte (hierbei handelt es sich sozusagen um die laborinterne Vergleichspräzision für die Wellenlängenlage).

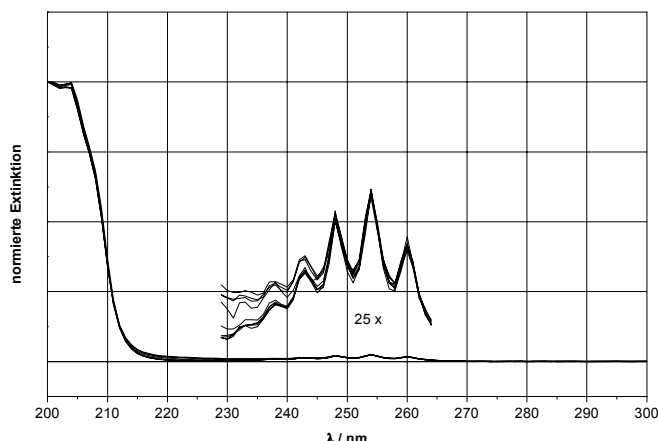


Abb. 16: Neun Spektren des Benzols, normiert auf das Maximum Eins und aufgenommen über einen Zeitraum von acht Monaten (Oktober 1998 bis Juni 1999). Die Spektren wurden im Rahmen der Messung einer Kontrolllösung (s. Abschnitt 3.2.3) erfasst. Die Messungen wurden von verschiedenen Bearbeiter(inne)n unter häufiger Erneuerung des Laufmittels durchgeführt.

Ebenso traten lediglich sehr geringe Schwankungen in den relativen Intensitäten bei unterschiedlichen Wellenlängen auf (die scheinbar größeren Schwankungen am kurzwelligen Ende der Vibrationsfeinstruktur resultieren aus der Normierung, zusätzlich ist die starke Vergrößerung zu beachten), die allerdings bei sehr niedrigen Analytkonzentrationen stärker wurden (vgl. [6]). Ferner wurden Vergleichsmessungen an Detektoren verschiedener Hersteller durchgeführt (Abb. 17).

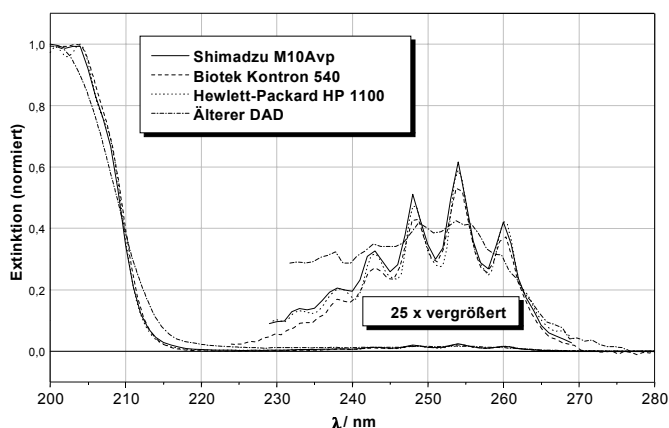


Abb. 17: UV-Spektrum von Benzol, gemessen mit Detektoren verschiedener Hersteller.

Sämtliche neueren DAD zeigten eine hervorragende Übereinstimmung bezüglich Wellenlängengenauigkeit, spektraler Auflösung und relativen Intensitäten, so dass hier von einem hohen Maß an Vergleichspräzision gesprochen werden kann.

Es ist in diesem Zusammenhang interessant, die Genauigkeit der HPLC-DAD-Spektren mit denjenigen von mittels GC-MS erhaltenen Massenspektren zu vergleichen: während bei üblicherweise eingesetzten Single-Quadrupole-Geräten die Lage der Peaks < 1 m/z genau gemessen wird, schwanken die Intensitätsverhältnisse der Peaks bei Mehrfachmessung z. T. erheblich. Dies liegt vor allem in der Tatsache begründet, dass ein einzelner "Full Scan" im Vergleich zu den mit Kapillarsäulen erzielten sehr geringen chromatographischen Peakbreiten einen relativ langen Zeitraum benötigt. Selbst im schnelleren, für eine ungerichtete Suchanalyse allerdings ungeeigneten "Selective-Ion-Monitoring"-Modus wurden bei den relativen Peakintensitäten im Bereich der Nachweisgrenzen immer noch erhebliche Schwankungen festgestellt [218].

Insgesamt kann festgehalten werden, dass der Beitrag der (Un-)Genauigkeit bei der Messung der Spektren zur gesamten Unsicherheit einer HPLC-DAD-Messung als vernachlässigbar angesehen werden kann. In beiden Punkten (Schwankung der relativen Intensitäten und Position des Spektrums) sollte darüber hinaus ein Unterschied zwischen Mess- und Methodenpräzision (vgl. Abschnitt 2.3.2) nur im Bereich niedriger Konzentrationen oder bei starken (und daher erkennbaren) Überlagerungen aus der Matrix zu erwarten sein (vgl. hierzu auch Abschnitt 4.5.4). Dies deckt sich auch mit den Erfahrungen aus der praktischen Arbeit mit der Spektrenbibliothek.

4.4.2 Genauigkeit der absoluten und relativen Retentionszeiten

Die wesentlichen Einflussgrößen für die Streuung der absoluten Retentionszeiten (RT) bei Wiederholungsmessungen mit der HPLC sind in Änderungen der Flussrate, der Zusammensetzung der mobilen Phase oder der Umgebungstemperatur zu suchen. Für die vorliegende Arbeit wurde angenommen, dass die Schwankungen der RT in erster Näherung nicht von der chemischen Struktur der Analyte abhängen (sie sollten allerdings mit wachsender Retentionszeit absolut zunehmen). Somit sollten die Ergebnisse von RT-Präzisionsbestimmungen für beliebig ausgewählte Substanzen als repräsentativ für alle anderen gelten können.

Wie bereits weiter oben erwähnt (Abschnitte 3.2.3 und 3.3.4), wurden vor jeder für die Spektrenbibliothek gemessenen Probenserie Kontrolllösungen vermessen, die neben Histamin zur Bestimmung der Totzeit u. a. auch die Standards für die Berechnung der relativen Retentionszeit (Gl. (2), S. 21), MPPH (Eluent A) und p-PBP (Eluent B) enthielten. Letztere wurden als im besonderen Maße repräsentativ angesehen, da ihre Messsignale nahe der Mitte des Chromatogramms zu finden waren. Insgesamt wurden die Kontrollmessungen über einen Zeitraum von 28 Monaten (Laufmittel A) bzw. 22 Monaten (Laufmittel B) durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 11 dargestellt.

Die Normalverteilung der Werte wurde durch einen Test nach dem Kolmogoroff-Smirnoff-Verfahren bestätigt. Die einzige Ausnahme bildeten die Werte von Histamin in Eluent A. Hierfür könnte die Überlagerung durch den ebenfalls unretinierten Lösungsmittelpik veranschaulicht gewesen sein; in Eluent B wurde auch für Histamin Normalverteilung gefunden.

Tab. 11: Fehler von RT_s und T_0 aus den Messungen der Standardlösung (s. Abschnitt 3.2.3), Messzeitraum: November 1998 – Februar 2001 (Eluent A) bzw. Juni 1999-März 2001 (Eluent B). VK = Variationskoeffizient.

Eluent	Parameter	Anzahl der Messungen	Mittelwert / min	Stdabw. / min	VK (rel. Stdabw. x 100 %)
A	T_0	167	1,922	0,057	3,0 %
	RT_s (MPPH)	166	12,591	0,382	3,0 %
B	T_0	49	1,844	0,092	5,0 %
	RT_s (p-PBP)	71	11,636	0,499	4,3 %

Als Maß für die Breite der Streuung wurde wegen deren Abhängigkeit von der Retentionszeit nicht die Standardabweichung, sondern der relative Fehler in Form des Variationskoeffizienten (VK) gewählt. Die Ergebnisse aus Tab. 11 bestätigen diesen Ansatz: vergleicht man die Werte von Histamin und dem sehr viel später eluierenden MPPH in Eluent A, so weist MPPH erwartungsgemäß eine wesentlich größere Standardabweichung auf. Die VK der beiden Substanzen betragen aber gleichermaßen 3,0 %; für Laufmittel B wurde aufgrund von Tab. 11 einheitlich ein VK von 5 % als repräsentativ angesetzt, auch wenn die Gründe für die Unterschiede zwischen den Laufmitteln unklar blieben.

Innerhalb des Zeitraums, über den die in Tab. 11 dargestellten Ergebnisse zusammengetragen wurden, wurde etliche Male das Laufmittel neu angesetzt, auch ein Wechsel der HPLC-Pumpe wurde vorgenommen; die Messungen wurden durch unterschiedliches Personal durchgeführt, ferner schwankte die Temperatur im Labor zwischen etwa 20 °C im Winter und z. T. nahe 30 °C im Sommer (es wurde kein Säulenofen eingesetzt). Vor diesem Hintergrund scheint es gerechtfertigt, hier von der maximal zu erwartenden laborinternen Vergleichspräzision (intermediate precision) zu sprechen, die einer "echten", laborübergreifend ermittelten Vergleichspräzision vermutlich sehr nahe kommen dürfte.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Wiederholpräzision am selben Tag (s. Abschnitt 3.3.4) in Eluenten A zeigt Tab. 12.

Tab. 12: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederholpräzision aus derselben Probe in Eluent A über einen Zeitraum von 9 h und 40 min. Zwischen den einzelnen Messungen wurden jeweils Leerproben analysiert. Die gegenüber Tab. 11 veränderten Mittelwerte erklären sich aus einem zwischenzeitlichen Umbau der HPLC-Anlage.

Parameter	Anzahl der Messungen	Mittelwert / min	Standardabweichung / min	VK / %
RT Histamin [min]	15	1,780	0,017	0,9
RT MPPH [min]	15	12,458	0,016	0,2

Während die Retentionszeit von MPPH einen gegenüber der laborinternen Vergleichspräzision sehr niedrigen VK von 0,2 % aufweist, liegt dieser Wert für Histamin bei 0,9 %. Dabei handelt es sich um den kleinstmöglichen Wert (außer Null), da in der verwendeten HPLC-Methode nur alle zwei Sekunden ein Spektrum registriert wurde (entsprechend einem Intervall von 0,033 min). Tatsächlich wurde T_0 in neun von fünfzehn Fällen zu 1,767 min und in sechs Fällen zu 1,800 min bestimmt. Durch die entsprechend notwendige Rundung hätte eine neunmalige Abweichung vom Mittelwert in Höhe von –0.2 % zusammen mit einer sechsmaligen

Abweichung von + 0,2 % zum selben Ergebnis geführt. Vor diesem Hintergrund und auch aus der täglichen Praxis heraus scheint es gerechtfertigt, für die tagesaktuelle Wiederholpräzision der RT einen VK von 0,2 % als typisch anzunehmen

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse befinden sich im Einklang mit Angaben aus der Literatur. So fanden z. B. Chen et al. [219] mit einer 15-cm-Säule (also 10 cm kürzer als die in der vorliegenden Arbeit verwendete) Variationskoeffizienten von 0,2-0,3 % für RT_i bei direkt aufeinander folgenden Messungen und erwarteten VK in der Größenordnung "einiger weniger Prozent" für Messungen an verschiedenen Tagen.

4.4.3 Fehler der RRT

Ausgehend von der Formel für die $RRT_{i,s}$ (Gl. (2), S. 21), wurde nach dem Gesetz der Fehlerfortpflanzung eine Formel für den Absolutfehler $\Delta RRT_{i,s}$ der RRT ermittelt (Gl. (21), Herleitung s. Abschnitt 9.1).

$$\Delta RRT_{i,s} = \frac{VK_{RT} / 100 \%}{(RT_s - T_0)^2} \sqrt{[(RT_s - T_0) \times RT_i]^2 + [(RT_i - RT_s) \times T_0]^2 + [(RT_i - T_0) \times RT_s]^2} \quad (21)$$

Aus Gl. (21) ergibt sich eine direkte Proportionalität zwischen dem Absolutfehler der RRT und dem VK. In der Konsequenz würde bei doppelt so großer Streuung der Messwerte aus den Messungen zur Bestimmung der Präzision ein doppelt so großes RRT-Fenster resultieren.

Während ΔRT_i , $RRT_{i,s}$ und der Absolutfehler $\Delta RRT_{i,s}$ linear mit RT_i wachsen, nimmt der $VK_{RRT_{i,s}} = (\Delta RRT_{i,s} / RRT_{i,s}) \times 100 \%$ schnell deutlich ab (Abb. 18).

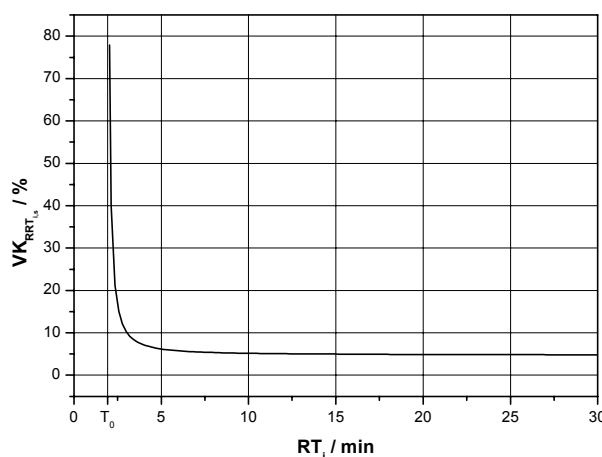


Abb. 18: Auftragung des Variationskoeffizienten von $RRT_{i,s}$ gegen RT_i , berechnet durch Einsetzen der Daten aus Tab. 11 für Eluent A in Gl. (21). Die Abbildung stellt die laborinterne Vergleichspräzision der RRT in Form des VK und in Abhängigkeit von der Retentionszeit dar.

Bei $RT_i = RT_s$ wird ein VK von ca. 5 % erreicht und für größere RT_i nur noch unwesentlich unterschritten. Obwohl sich die RRT aus mehreren fehlerbehafteten Größen zusammensetzt, liegt der gefundene VK also geringfügig über demjenigen der RT. Dies erscheint auf den ersten

Blick paradox, war die RRT doch gerade zu dem Zweck eingeführt worden, Schwankungen bei der absoluten Retentionszeit auszugleichen.

Die Ursache hierfür liegt in einem Problem, welches das Konzept der Fehlerfortpflanzung mit sich bringt: die Schwankungen der Totzeit T_0 und der Retentionszeit des Standards RT_S verlaufen in Wirklichkeit relativ zueinander nicht statistisch, sondern weitgehend gleichsinnig (die RRT sollte ja gerade systematische Verschiebungen ausgleichen). Gl. (29) gibt somit ein tatsächlich eher unwahrscheinliches "Worst-Case-Szenarium" wieder. Bei tagesaktueller Berechnung sollte sich ein deutlich kleineres $\Delta RRT_{i,s}$ ergeben. Dies wurde folgendermaßen bestätigt:

Aus der Messreihe für die laborinterne Wiederholpräzision in Eluent A (mit 166 Messwerten, s. Tab. 11) wurden Werte für eine fiktive, täglich gemessene Retentionszeit RT_i einer Substanz i mit dem Mittelwert und der Standardabweichung von RT_S (also der absoluten Retentionszeit des Standards MPPH) konstruiert, indem die dort gemessenen Werte durch Umsortieren anderen Tagen zugeordnet wurden. Anschließend wurde tagesaktuell $RRT_{i,s}$ berechnet (MS Excel [213]), wobei sich über den gesamten Messzeitraum von 28 Monaten für $RRT_{i,s}$ eine Verteilung mit einer Standardabweichung von nur 0,004 bei einem Mittelwert von 1,002 ergab ($VK_{RRT_{i,s}} = 0,4 \%$).

Dieses Ergebnis belegt, dass $\Delta RRT_{i,s}$ durch Gl. (29) wirklich deutlich überschätzt wird. Andererseits war es u. a. auch das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Messunsicherheit der HPLC-DAD unter der Voraussetzung zu bestimmen, dass die in der Abt. Toxikologische Chemie des Instituts für Rechtsmedizin der HU gemessene Spektrenbibliothek durch unterschiedliche Anwender/-innen in verschiedenen Laboratorien eingesetzt würde. Hierfür erschien obiger "Worst Case" letztlich doch geeigneter als ein eher niedrig angesetzter VK in Höhe von nur 0,4 %. Da eine "echte" laborübergreifende Vergleichspräzision nicht ermittelt werden konnte, wurde $\Delta RRT_{i,s}$ für die nachfolgenden Betrachtungen zur Selektivität (Abschnitt 4.5) demzufolge doch auf der Grundlage von Tab. 11 und Gl. (29) berechnet. Ein weiterer Vorteil dieser sehr konservativen Fehlerschätzung liegt in der Vermeidung einer Überbewertung der Methode.

Im Vergleich zu den hier vorgestellten Ergebnissen ermittelten Bogusz und Erkens [122] für das Konzept der Retentionsindizes (vgl. Abschnitt 2.2.2) in zwei verschiedenen Laboratorien und mit zwei verschiedenen C_{18} -Säulen Retentionsindizes (auf einer Skala von 0 bis 1.000) für 148 Wirkstoffe mit Standardabweichungen bis zu 8,4 Indexpunkten, erzielten also VK von knapp 1 %. Allerdings stieg bei niedrigen Retentionsindizes der relative Fehler ähnlich stark an wie im Bereich kleiner RT_i in Abb. 18. Gegenüber dem RRT-Konzept erwiesen sich die Retentionsindizes trotz erheblich größeren experimentellen Aufwandes somit nicht als deutlich präziser.

4.5 Selektivität

Die Einschätzung der Selektivität der in der vorliegenden Arbeit behandelten HPLC-DAD-Methode sollte vor allem durch die Berechnung verschiedener Selektivitätsparameter (s. Abschnitt 2.4.2) erfolgen. Voraussetzung hierfür war der paarweise Vergleich aller in der Spektrenbibliothek enthaltenen Substanzen und die Auszählung der als identisch bzw. als nicht

voneinander unterscheidbar zu wertenden Substanzpaare. Nach einer eingehenderen Behandlung der Probleme bei der chromatographischen Trennung werden in den Abschnitten 4.5.3 und 4.5.4 zunächst geeignete Identifikationskriterien ermittelt, in Abschnitt 4.5.5 wird die für die Auszählung entwickelte Methode beschrieben. In den darauf folgenden Abschnitten werden die verschiedenen Selektivitätsparameter diskutiert und ein zusätzlicher Parameter wird aus Gl. (6), der Kaiserschen Formel für die Selektivität, hergeleitet. Schließlich werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vorgestellt und mit Werten aus der Literatur verglichen.

4.5.1 Verteilung der RRT-Werte auf den Messbereich

De Zeeuw [107] fordert für ein selektives Trennverfahren idealerweise die gleichmäßige Verteilung der zu messenden Substanzen über den gesamten Retentionszeitbereich. Es liegt auf der Hand, dass es sich angesichts von beschränkter Analysenzeit und von Spektrenbibliotheken mit mehreren tausend strukturell enorm heterogenen Wirkstoffen hierbei nur um eine Idealvorstellung handeln kann.

Die Häufigkeitsverteilung der RRT-Werte aus der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Spektrenbibliothek über den Messbereich ist - getrennt nach Eluenten - in Abb. 19 dargestellt. Da die Standards für die RRT-Berechnung jeweils bei etwa 12 min eluierten (T_0 ca. 2 min), entspricht eine RT von 30 min in etwa einer RRT von 2,6.

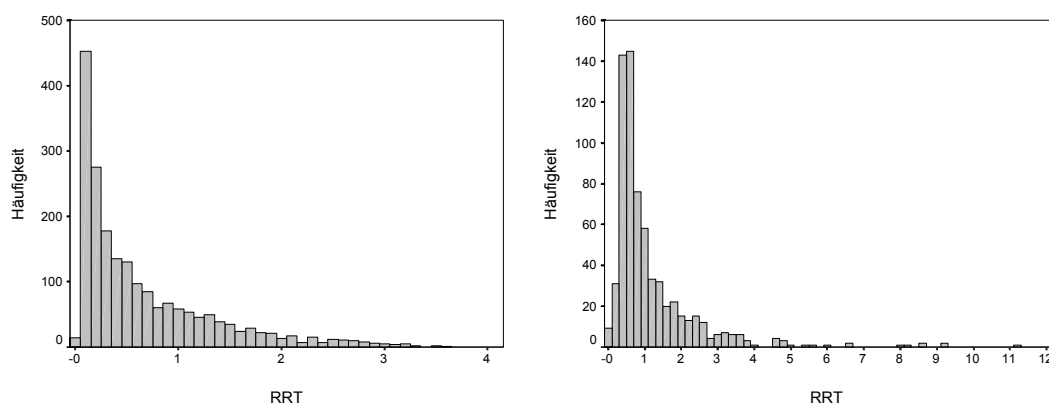


Abb. 19: Häufigkeitsverteilung über den RRT-Bereich [links: El. A ($n = 1.993$, ca. 75 % aller Substanzen), rechts: El. B ($n = 677$, ca. 25 %)]. Die Differenz von n zur oben angegebenen Gesamtzahl von 2.682 erklärt sich durch 12 Substanzen, die selbst im stärkeren El. B nicht innerhalb einer Stunde eluiert wurden (RRT von 5,000 und darüber (rechtes Bild) wurden zufällig in später nachfolgenden Messungen entdeckt).

Die erhaltenen Ergebnisse sind sicherlich alles andere als gleichverteilt. Bei beiden Eluenten, insbesondere bei El. A, ist stattdessen eine ausgeprägte Anhäufung von Substanzen im vorderen Teil des Chromatogramms festzustellen. In der Zusammenschau mit der Auftragung des $VK_{RRTi,s}$ (Abb. 18, S. 72) ergibt sich insgesamt ein ungünstiges Bild insbesondere für die ersten Minuten des Chromatogramms, in denen sowohl eine Häufung von Substanzen, als auch ein großer relativer Fehler von $RRT_{i,s}$ beobachtet wird. Eine deutlich symmetrischere Verteilung wäre vermutlich durch den Einsatz eines Gradientensystems zu erwarten gewesen. Aus den folgenden

Gründen wurde jedoch an der etablierten isokratischen Methode (Abschnitt 3.1.6) festgehalten:

- Ein Gradientensystem benötigt teurere Pumpen; von einer Umrüstung wären vier HPLC-Anlagen betroffen gewesen. Obendrein haben sich Gradientenpumpen als anfälliger für technische Störungen erwiesen.
- Nur bei einem isokratischen Verfahren kann das Laufmittel im Kreis geführt werden. Dies spart nicht nur immense Kosten (2 l Eluent halten im Routinebetrieb etwa einen Monat vor), es entlastet auch die Umwelt.
- Rekonditionierungspausen zwischen zwei Messungen entfallen, die Systeme stehen im Notfall schneller zur Messung bereit.
- Die Retentionszeiten sind im isokratischen Betrieb weitaus besser reproduzierbar.

Es wurden aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit und im Vorfeld der Neumessung der Spektrenbibliothek einige neu auf den Markt gekommene Trennsäulen daraufhin untersucht, ob sie bei isokratischer Fahrweise möglicherweise zu einer besseren Verteilung über den Retentionszeitbereich führen würden.

4.5.2 Prüfung neuer Trennsäulen

Es wurden drei neue stationäre Phasen gegen die bereits bewährte Trennsäule ("RP8ec", zu den Kenndaten und zur Erläuterung der hier verwendeten Kurzbezeichnungen s. Abschnitt 3.4) getestet. Die Eigenschaften dieser Materialien (Herstellerangaben) sollen kurz wiedergegeben werden:

"RP8ec": Laut Fa. Merck eignet sich das enthaltene Endcapped-C₈-Material besonders zur Trennung von Substanzen unterschiedlicher Polaritäten und Molekulargewichte bei hoher Selektivität und Peaksymmetrie. Stark polare, insbesondere kationische, Verbindungen eluieren in der Nähe der Totzeit.

"Cation Duet": Dies ist eine sog. "Mixed Mode" - Säule, die laut Herstellerangabe zu 50 % aus C₁₈-Material ("Hypersil ODS") und zu weiteren 50 % aus einer Kationenaustauscherphase ("Hypersil SCX") besteht. Die Retention wird hier durch eine Überlagerung ionischer und lipophiler Wechselwirkungen erzielt, angeblich auch für viele Verbindungen, die auf herkömmlichen RP-Phasen überhaupt nicht retiniert werden.

"ODS-AQ": Laut Hersteller handelt es sich hierbei um ein RP₁₈-Material, dessen freie Silanolgruppen durch gezieltes Endcapping mit hydrophilen, nichtionischen Resten deaktiviert wurden. Dadurch soll sich eine erhöhte Selektivität für polare Substanzen ergeben, die an herkömmlichen RP-Phasen keine Retention zeigen. Auch bei hohen Wassergehalten blieben die Bürstenstruktur der C₁₈-Reste und damit die RP - Eigenschaften des Materials voll erhalten.

"C18-AQ": Die Beschreibung des Herstellers deckt sich fast genau mit derjenigen der ODS-AQ- Säule.

Für den Säulenvergleich wurden die in Tab. 13 aufgeführten 23 Wirkstoffe aus verschiedenen Retentionszeitbereichen der RP8ec-Säule ausgewählt, wobei insbesondere an dieser Säule nicht oder nur wenig retinierte Verbindungen berücksichtigt wurden. Weiterhin wurde darauf geachtet,

ein möglichst breites Spektrum an funktionellen Gruppen einzubeziehen. Zur späteren Auswertung wurden die Substanzen nach ihrem Säure-Base-Verhalten in drei Kategorien unterteilt: stärkere Basen, schwächere Basen sowie Neutralstoffe / schwache Säuren. Die Nettoretentionszeiten $RT' = RT - T_0$ der Wirkstoffe sowie die Quotienten $Q = RT'_{\text{neue Säule}} / RT'_{\text{RP8ec}}$ sind in Tab. 13 wiedergegeben.

Tab. 13: Retentionsverhalten an den Säulen Lichrospher 100-5 RP8ec, Hypersil Cation Duet 5 μm , YMC Pack ODS-AQ und Prontosil 120-3-C18-AQ für ausgewählte Wirkstoffe in den mobilen Phasen A und B. RT' = Nettoretentionszeit ($RT - T_0$) in min; $Q = RT'_{\text{neue Säule}} / RT'_{\text{RP8ec}}$, n. e. = nicht eluiert. Die Zahlen in Klammern hinter den Wirkstoffnamen bezeichnen diese in den folgenden Abbildungen.

Säule	RP8ec		Cation Duet				ODS-AQ		C18-AQ	
Eluent	A	B	A		B		A		A	
Parameter	RT'	RT'	RT'	Q	RT'	Q	RT'	Q	RT'	Q
Stärkere Basen										
Amitriptylin (1)	13,06	2,46	176,33	13,50	27,67	11,25	3,93	0,30	4,70	0,36
Atenolol (2)	0,36	0,13	16,13	44,81	12,80	98,46	0,10	0,28	0,10	0,28
Dihydralazin (3)	0,06	0,00	n. e.	-	n.e.	-	0,00	-	0,03	0,50
Diphenhydramin (4)	7,16	1,73	236,27	33,00	18,97	10,97	1,80	0,25	2,17	0,30
Histamin (5)	0,00	0,00	n.e.	-	n.e.	-	0,00	-	0,00	-
Isoniazid (6)	0,16	0,13	26,77	167,31	10,13	77,92	0,07	0,44	0,10	0,63
Meclocyclin (7)	3,69	0,83	53,77	14,57	14,70	17,71	1,17	0,32	1,43	0,39
Morphin (8)	0,36	0,19	25,80	71,67	19,37	101,95	0,10	0,28	0,13	0,36
Pirbuterol (9)	0,29	0,16	n.e.	-	n.e.	-	0,07	0,24	0,07	0,24
Sertindol (10)	22,93	2,39	n.e.	-	31,40	13,14	7,80	0,34	9,20	0,40
Sotalol (11)	0,66	0,33	16,87	25,56	10,77	32,64	0,17	0,26	0,20	0,30
Schwächere Basen										
Coffein (12)	0,89	0,49	1,30	1,46	0,77	1,57	0,47	0,53	0,53	0,60
Diazepam (13)	15,03	3,03	36,33	2,42	3,33	1,10	10,43	0,69	10,37	0,69
Neutralstoffe / Schwache Säuren										
Benzol (14)	13,19	3,43	7,27	0,55	1,50	0,44	10,07	0,76	9,67	0,73
Ethenzamid (15)	3,59	1,16	2,10	0,58	0,47	0,41	1,93	0,54	2,00	0,56
Indomethacin (16)	48,16	3,63	26,50	0,55	1,70	0,47	39,33	0,82	39,60	0,82
MPPH (17)	10,86	1,76	5,77	0,53	0,67	0,38	6,53	0,60	6,83	0,63
Nonivamid (18)	33,73	3,29	16,90	0,50	1,33	0,40	22,97	0,68	23,40	0,69
Phenobarbital (19)	3,66	1,09	1,90	0,52	0,30	0,28	2,13	0,58	2,27	0,62
Prednison (20)	3,56	0,93	2,43	0,68	0,47	0,51	2,17	0,61	2,27	0,64
Salicylsäure (21)	4,36	1,33	2,00	0,46	0,33	0,25	2,63	0,60	2,83	0,65
Sulfosalicylsäure (22)	0,19	0,00	0,00	-	0,00	-	0,17	0,89	0,27	1,42
Warfarin (23)	24,63	3,06	12,67	0,51	1,23	0,40	18,70	0,76	18,83	0,76

In die Gruppe der stärkeren Basen wurden vor allem Substanzen mit aliphatischen Amino- bzw. mit Hydrazidgruppen eingeordnet (pK_a des korrespondierenden Kations > 6). Als schwächere

Basen sollten hier hingegen Verbindungen mit protonierbaren, ungesättigten Stickstoffzentren oder aromatischen Aminogruppen verstanden werden (pK_a des korrespondierenden Kations < 6). Wirkstoffe ohne Stickstoff mit Carboxylgruppen bzw. mit z. T. aziden Amid- oder Imidgruppen fielen in die Gruppe der Neutralstoffe / schwachen Säuren.

Im folgenden sollen die sehr ähnlichen Säulen ODS-AQ und C18-AQ gemeinsam behandelt werden, während die stark davon abweichende Cation Duet-Säule gesondert betrachtet wird.

Das Verhalten der getesteten Säulen im Vergleich zur RP8ec wird in Abb. 20 aus der doppeltlogarithmischen Auftragung der RT' -Werte gegeneinander ersichtlich.

ODS-AQ und C18-AQ verhielten sich unter den hier vorgegebenen Untersuchungsbedingungen weitgehend gleich. Insbesondere für die stärkeren Basen konnte mit Q -Werten zwischen 0,28 und 0,63 die erwartete Verlängerung der Retentionszeit nicht festgestellt werden. Schwächere Basen und Neutralstoffe werden im Vergleich hierzu mit $Q = 0,56$ bis 1,42 allerdings etwas stärker retiniert. Wie aus Abb. 20 b ersichtlich ist, werden bis auf wenige Ausnahmen die Wirkstoffe auch in der gleichen Reihenfolge wie an der RP8ec-Säule eluiert. Bei Beibehaltung der mobilen Phase ergeben sich somit gegenüber dieser keine nennenswerten Vorteile.

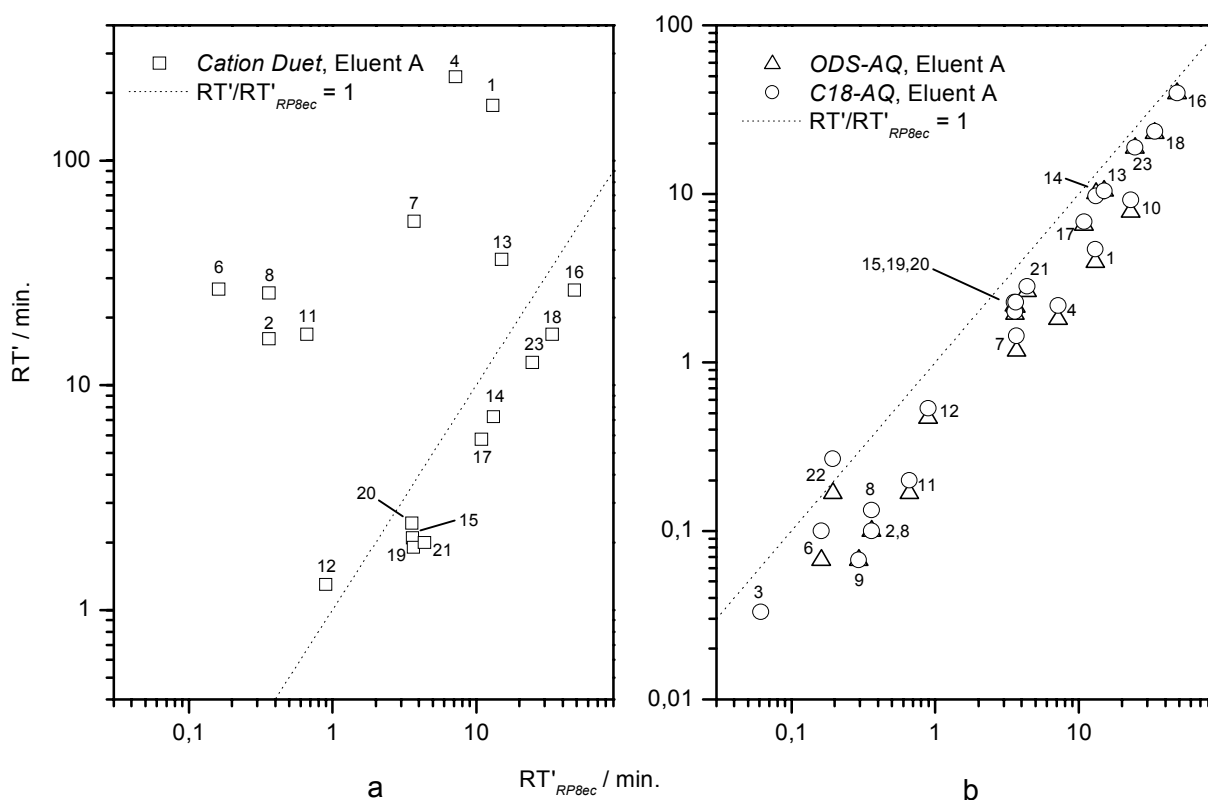


Abb. 20: Auftragung der mit den Säulen (a) Cation Duet bzw. (b) ODS-AQ und C18-AQ gemessenen Nettoretentionszeiten von 23 Wirkstoffen gegen die entsprechenden Werte an der RP8ec-Säule (mobile Phase A, Zuordnung der Wirkstoffe s. Tab. 13). Die gepunkteten Linien ($x = y$) bezeichnen eine gegenüber der RP8ec-Säule unveränderte Retention.

Für die Cation-Duet-Säule zeigten sich hingegen im Vergleich mit der RP8ec erhebliche Verschiebungen von RT' für die meisten Verbindungen. Insbesondere ergab sich aufgrund

ionischer Wechselwirkungen eine deutliche Verlängerung der Retentionszeiten und damit eine erhöhte Selektivität für basische Wirkstoffe. Auffällig war ein Zusammenhang zwischen dem Protonierungsgrad und Q. Die als stärkere Basen eingeordneten und somit beim vorliegenden pH 2,3 einfach kationischen Verbindungen zeigten in der mobilen Phase A Q-Werte zwischen 13 und 170. Die beiden schwächeren Basen lagen mit $Q = 1,10$ und $1,57$ erheblich niedriger. Während die Neutralstoffe/schwachen Säuren (14 - 23) keine Wechselwirkungen mit dem Kationenaustauscheranteil der Cation Duet-Säule zeigten, mit Nettoretentionszeiten etwas unter denen bei ODS-AQ und C18-AQ, wurden durch mehrere basische Zentren gekennzeichnete und damit bei pH 2,3 dikationisch vorliegende Verbindungen wie Dihydralazin (3), Histamin (5) und Pirbuterol (9) auch nach verlängerter Messzeit nicht detektiert. Die Verhältnisse sind in Abb. 21 anhand der Strukturformeln von 5 Verbindungen verdeutlicht.

Neben Q war auch der Einfluss des Acetonitrilgehaltes in der mobilen Phase aus dem Verhältnis der Retentionszeiten RT'_A/RT'_B ersichtlich. Bei lipophilen basischen Verbindungen wie Amitriptylin wurde RT' durch den erhöhten Anteil des Modifiers in der mobilen Phase B sehr stark verkürzt, während beim viel hydrophileren Atenolol kaum ein Effekt auftrat, da hier vor allem die ionische Wechselwirkung die Retention dominierte. Dieser Unterschied galt in ähnlicher Weise für die schwächer basischen Verbindungen Diazepam und Coffein, wobei für beide Verbindungen die Ionenwechselwirkung viel schwächer ausgeprägt war. Auch für die übrigen Substanzen waren größere Q-Werte bei stärker basischen Verbindungen zu erkennen. Gleichzeitig zeigte sich, dass erwartungsgemäß die Umstellung von Eluent A auf den stärkeren Eluenten B bei den eher lipophileren Komponenten zu größeren RT'_A/RT'_B - Werten führte als bei den hydrophileren Verbindungen vergleichbarer Basizität.

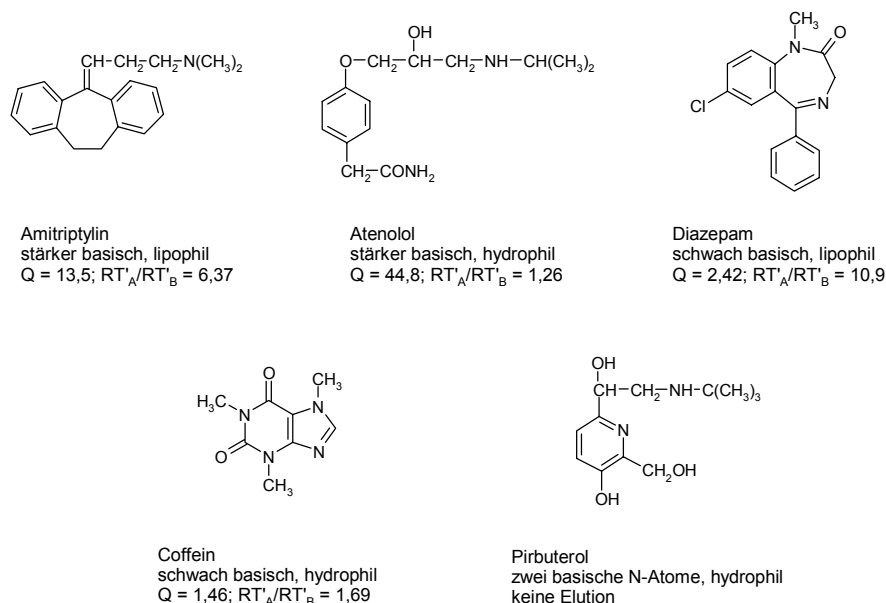


Abb. 21: Struktureinflüsse ausgewählter Verbindungen auf das Retentionsverhalten an der Cation-Duet-Säule. Q = Verhältnis der Nettoretentionszeiten $RT'_{\text{Cation Duet}} / RT'_{\text{RP8ec}}$; RT'_A/RT'_B = Nettoretentionszeitverhältnis zwischen den Eluenten A und B.

Die Vor- und Nachteile der Cation-Duet-Säule für den hier angestrebten Einsatz in der Systematischen Toxikologischen Analyse werden aus der Gegenüberstellung der Chromatogramme des Testgemisches an dieser Säule für die Eluenten A und B mit dem an der Lichrosphersäule im Eluenten A in Abb. 22 deutlich.

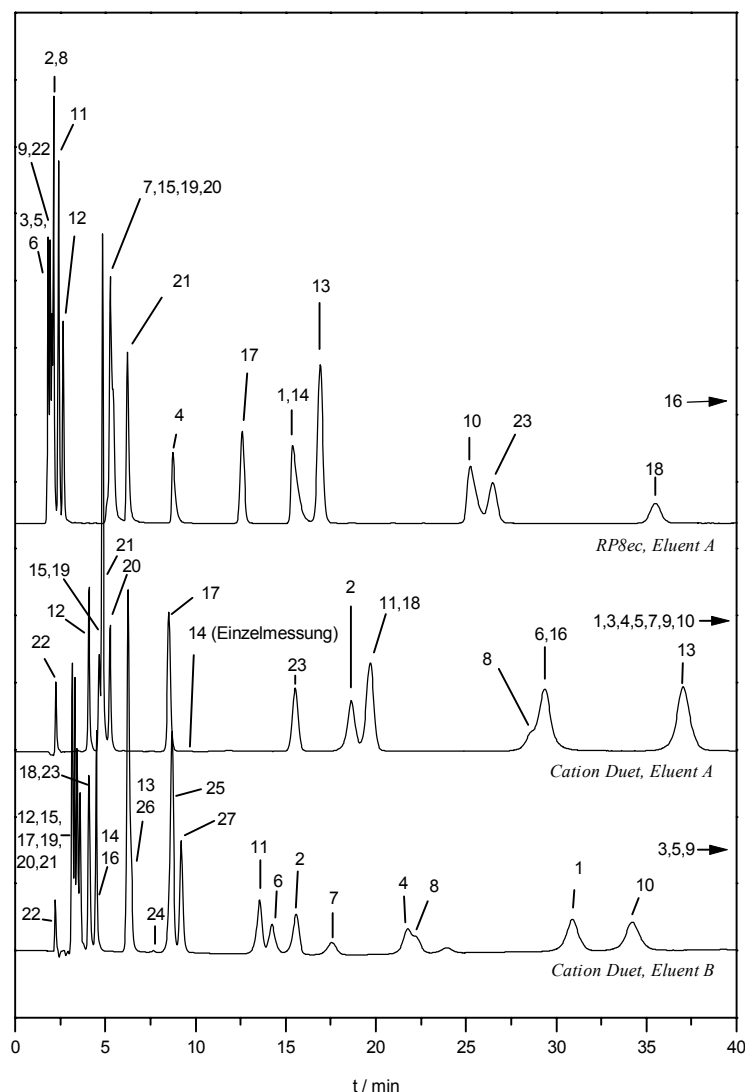


Abb. 22: Chromatogramme des Testgemisches an den Säulen Lichrospher RP8ec (mobile Phase A) und Hypersil Cation Duet (mobile Phasen A und B). Die Detektion erfolgte bei 225 nm. Zur Zuordnung der Wirkstoffe s. Tab. 13, zusätzlich wurden die Substanzen 24 (Phenylalanin), 25 (Tryptophan), 26 (Tyrosin) und 27 (p-Phenylbenzophenon) nur in der unteren Messung zu Vergleichszwecken mitgemessen.

In Eluent A kam es zu einer vorteilhaften Entzerrung der vor allem von basischen hydrophilen Verbindungen herrührenden Peaks am Beginn des Chromatogramms. Allerdings wurden dabei gleichzeitig die Substanzen mit zwei basischen Gruppen sowie wichtige lipophile Verbindungen wie Amitriptylin (Substanz 1) über die übliche Messzeit hinaus im Chromatogramm nach hinten verschoben. Beim Übergang zur mobilen Phase B lagen nur noch die Dikationen außerhalb des Messbereiches, jedoch waren hier die hydrophilen Neutralverbindungen am Anfang des Chromatogramms zusammengedrängt. In weiteren, hier nicht dargestellten Messungen zeigte sich, dass wichtige Analyte wie Opiate, β -Blocker und Amphetamine in beiden mobilen Phasen

in einen gut aufgelösten Retentionszeitbereich gelangten. Verbindungen mit zwei oder mehr basischen Zentren waren bei pH 2,3 auf dieser Säule offensichtlich grundsätzlich nicht eluierbar und gingen der Detektion verloren.

Neben der Trennfähigkeit für die durch Probenaufbereitung abgetrennten Analyte war auch die Lage von Störsignalen, etwa durch mitextrahierte Matrixbestandteile, von Interesse. Dies ist besonders wichtig, wenn bei stark hydrophilen Analyten das Serum nach Eiweißfällung ohne weiteren Extraktionsschritt direkt chromatographisch untersucht wird.

Im Chromatogramm für Eluent B in Abb. 22 ist deutlich zu sehen, dass auf der Cation-Duet-Säule die in diesem Zusammenhang zu erwartenden UV-absorbierenden Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin (Substanzen 24-26) mit Retentionszeiten zwischen 6 und 10 min weit in den sonst matrixfreien Raum hineinverschoben sind. Als Beispiel für eine massive Belastung mit Störpeaks aus der Matrix ist in Abb. 23 das Chromatogramm einer Serumprobe mit und ohne Zusatz von $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Sotalol nach Eiweißfällung dargestellt.

Die offensichtlich kationische Zentren enthaltenden Matrixbestandteile dominieren bis zu 12 min und machen in diesem Retentionszeitbereich eine Substanzidentifizierung fast unmöglich (jedoch ist das Sotalol gut abgetrennt und bestimmbar). Auf der RP8ec-Säule werden diese Matrixbestandteile im wesentlichen innerhalb der ersten zwei Minuten eluiert, wobei Sotalol davon völlig überdeckt wird.

Neben den Retentionsdaten wurde zusätzlich die Asymmetrie der gemessenen Peaks ermittelt. Des weiteren wurde jeweils die theoretische Trennstufenzahl bestimmt. Es zeigten sich keine gravierenden Unterschiede zwischen den getesteten Säulen. Die Cation-Duet-Säule zeigte sogar im Mittel etwas symmetrischere Peaks als ODS-AQ und C18-AQ. Die allgemein für einen Wechsel zu $3\text{-}\mu\text{m}$ -Säulen ins Feld geführten Argumente höherer Trennleistung und symmetrischerer Peaks konnten somit im Rahmen dieser Untersuchung nicht bestätigt werden, was jedoch durch die zusätzlich veränderten geometrischen Dimensionen dieser Säulen bedingt sein kann.

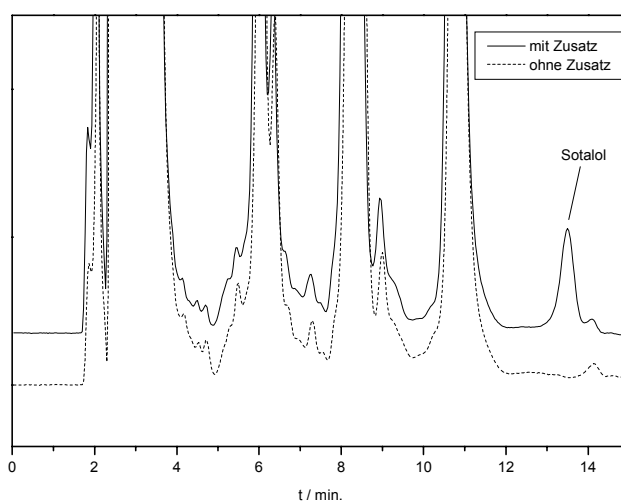


Abb. 23: Chromatogramm einer Serumprobe mit und ohne Zusatz von $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Sotalol auf der Cation-Duet-Säule. Probenaufbereitung: Eiweißfällung durch Zusatz von $200 \mu\text{l}$ Acetonitril zu $200 \mu\text{l}$ Serum, Vortexen und Zentrifugieren. $50 \mu\text{l}$ des Überstandes wurden direkt in die HPLC-Anlage injiziert.

Von den untersuchten Säulen stellt vor allem Cation Duet eine interessante Bereicherung für die Systematische Toxikologische Analyse (STA) in saurer mobiler Phase dar. Die Kombination von RP- und Kationenaustauschermaterial in einer Säule führt zu einer eindeutigen Verbesserung der Trennung basischer Substanzen geringer und mittlerer Lipophilie und bringt z. B. für Opiate, Amphetamine und β -Rezeptorenblocker eine deutliche Verbesserung. Die befriedigende Erfassung aller für die STA relevanten Substanzen in einem isokratischen Lauf wird jedoch auch mit dieser Säule nicht erreicht: wichtige Wirkstoffe werden zu stark retiniert und störende Matrixkomponenten, die auf der RP8ec nur ganz am Anfang des Chromatogramms zu finden waren, verteilen sich nun über das gesamte Chromatogramm.

Insbesondere der letzte Punkt führte dazu, dass für die Neumessung der Spektrenbibliothek die bereits bewährte RP8ec-Säule als Standardsäule beibehalten wurde. Die Cation-Duet-Säule kann aber - zumindest für die gegenüber den mittels Eiweißfällung aufgearbeiteten Proben wesentlich matrixärmeren Dichlormethanextrakte - als eine wichtige Ergänzung für die Bestimmung hochpolarer Analyte angesehen werden. Der gemeinsame Einsatz von Restricted-Access-Materialien (vgl. Abschnitt 2.1.4) für die Probenaufarbeitung und der Cation-Duet-Säule für die Auftrennung könnte einen weiteren interessanten Ansatz zur Bestimmung dieses für die RP-Chromatographie problematischen Substanzkreises darstellen.

4.5.3 Identifizierung über die RRT

Zunächst stellte sich die Frage, ob für die Substanzidentifikation über die RRT der Wahrscheinlichkeits- oder der Fensteransatz verwendet werden sollte (vgl. Abschnitt 2.2.2). Der Nachteil des Fensteransatzes liegt sicher in der Gleichbehandlung aller in das RRT-Fenster fallenden Referenzwerte, wodurch die Anzahl potenzieller Kandidaten zu hoch geschätzt wird. Andererseits bleibt unklar, wie wertvoll eine konkrete Wahrscheinlichkeitsangabe angesichts der Tatsache sein kann, dass sie i. d. R. auf der Grundlage einer einzigen Messung ermittelt wurde. Werden beispielsweise zwei mögliche Kandidaten mit Wahrscheinlichkeiten von 95 bzw. 75 % gefunden, erscheint die Auswahl zwischen beiden auf dieser Basis willkürlich. Dies gilt auch, wenn nur ein Kandidat mit vergleichsweise geringer Wahrscheinlichkeit gefunden wird. Liegt der Referenzwert einer anderen Substanz zufällig näher am gemessenen Wert als der eigentlich richtige, verführt darüber hinaus die Rangfolge der Wahrscheinlichkeiten zu einer falschen Zuordnung.

Der Fensteransatz erkennt dagegen die Grenzen einer einmaligen Messung an und behandelt alle Kandidaten im RRT-Fenster gleich. Gleichzeitig spiegelt der Verzicht auf eine Hierarchie der "Treffer" auch die begrenzte Selektivität eines Retentionsparameters für große Substanzkollektive wider. Ein weiterer Pluspunkt besteht im geringeren Rechenaufwand. All diese Betrachtungen führten dazu, dass für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Selektivitätsberechnungen der Fensteransatz verwendet wurde.

Im zweiten Schritt musste ein Wert für die Exzentrizität z (Abschnitt 2.2.2) und damit für die Breite des RRT-Fensters, vorgegeben werden. Hier fiel die Entscheidung auf $z = 2$, so dass für eine gegebene Substanz der richtige Referenzwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95,4 %

innerhalb des RRT-Fensters zu finden sein sollte. Die Berechnungen zur Selektivität wurden allerdings zu Vergleichszwecken zusätzlich auch für $z = 1$ (68,3 % Sicherheit) durchgeführt.

Des weiteren war zu entscheiden, wie groß für eine gegebene Verbindung i die zu $RRT_{i,s}$ gehörige Standardabweichung s_i zu schätzen war. Wie bereits oben (Abschnitt 4.4.3) geschildert, wurden die RRT-Fenster, welche für die Berechnung der in Abschnitt 4.5.9 beschriebenen Ergebnisse verwendet wurden, als "Worst Case" auf der Grundlage des über die Fehlerfortpflanzung ermittelten $\Delta RRT_{i,s}$, Gl. (21), bestimmt. Aus den im Abschnitt 4.4.3 dargelegten Erwägungen geht hervor, dass somit die Zahl der wirklich in Frage kommenden Kandidaten durch die hier vorgestellten Ergebnisse deutlich über- und somit die Leistungsfähigkeit der Methode unterschätzt wird. Andererseits wird durch ein derart vergrößertes RRT-Fenster die Wahrscheinlichkeit eines falsch negativen Ergebnisses weiter verringert.

Da die Breite des Fensters letztlich durch das Produkt $z_i \times s_i$ bestimmt wird, führt eine um den Faktor 2 überschätzte Standardabweichung zu derselben Fenstervergrößerung wie eine Verdoppelung von z_i . Wäre ein realistischerer $VK_{RRT_{i,s}}$ statt mit 3 % mit 1,5 % für Eluent A angesetzt worden (2,5 % statt 5 % für Laufmittel B) so entsprächen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse einer Festsetzung von $z = 4$ und somit einer Aussagesicherheit von 99,99 %.

Insgesamt erschien die Festlegung eines $2s$ -RRT-Fensters als maßgebliches Identifikationskriterium trotz der damit verbundenen Überschätzung der Anzahl möglicher Kandidaten gegenüber einer zu niedrigen Schätzung unproblematischer. Im Zweifelsfall kann die Entscheidung für die richtige Substanz ohnehin durch eine Nachmessung der Retentionszeit des vermuteten Wirkstoffes unter den aktuellen Bedingungen geklärt werden; für diese gilt dann die wesentlich bessere Wiederholpräzision (s. Tab. 12).

4.5.4 Identifizierung über das UV-Spektrum

Als Kriterium für die Substanzidentifizierung auf der Basis der UV-Spektren wurde in der vorliegenden Arbeit der Similarity Index SI (vgl. Abschnitt 2.2.3) eingesetzt. Dabei bestand das Problem vor allem in der Festlegung eines geeigneten Schwellenwertes für den SI, oberhalb dessen ein Substanzpaar als identisch gewertet werden sollte.

Für den Fall ausreichend "sauberer", d. h. weder verrauschter noch überlagerter, Spektren wurde, auch aufgrund der jahrelangen Erfahrung mit der beschriebenen HPLC-DAD-Methode, ein Schwellenwert von 0,9990 festgelegt. Dass dieser Wert sinnvoll ist, verdeutlicht Abb. 24.

Liegt eine Substanz in einer Konzentration nahe der Bestimmungs- oder der Nachweisgrenze vor, oder ist ihr Spektrum durch andere Einflüsse (geringfügige Überlagerungen oder detektorseitiger Fehler ± 1 nm) leicht verschoben, so sind für den Vergleich mit der Reinsubstanz niedrigere SI-Werte zu erwarten. Sinken diese unter den Schwellenwert ab, folgt ein falsch negatives Ergebnis.

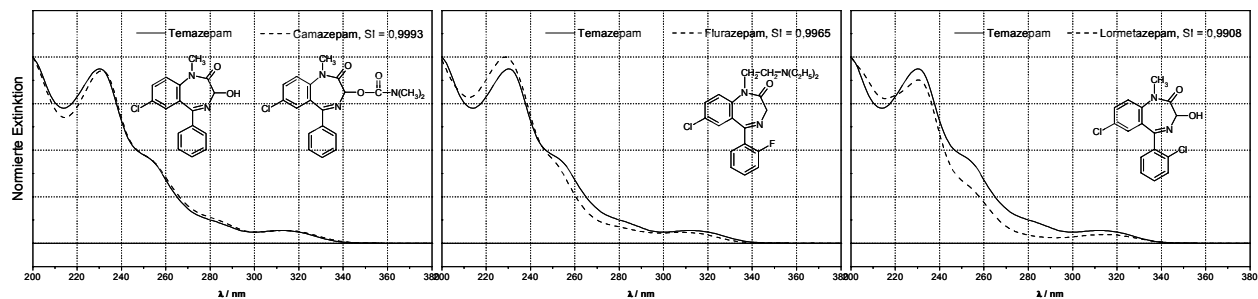


Abb. 24: UV-Spektren und SI-Werte dreier Benzodiazepine (Tranquilizer) im Vergleich mit dem Spektrum von Temazepam. Bei der Festsetzung eines SI-Schwellenwertes $> 0,9990$ könnte Camazepam (Bild links) nicht von Temazepam unterschieden werden, schon bei einem SI von 0,9965 (Flurazepam, Bild Mitte) sind allerdings deutliche spektrale Unterschiede im visuellen Vergleich sichtbar, die Verschiebung im Bereich um 262 nm beträgt hier bereits 5 nm. Lormetazepam (SI = 0,9908, Bild rechts) weist noch stärkere Unterschiede zur Vergleichssubstanz auf.

Um diese Einflüsse näher zu untersuchen, wurden in der im Abschnitt 3.5 näher beschriebenen Art und Weise die Spektren von fünf häufig im klinisch-toxikologischen Analysengut vorkommenden Substanzen mit spektralem Rauschen überlagert, bzw. um je 1 nm batho- sowie hypsochrom verschoben (Abb. 25).

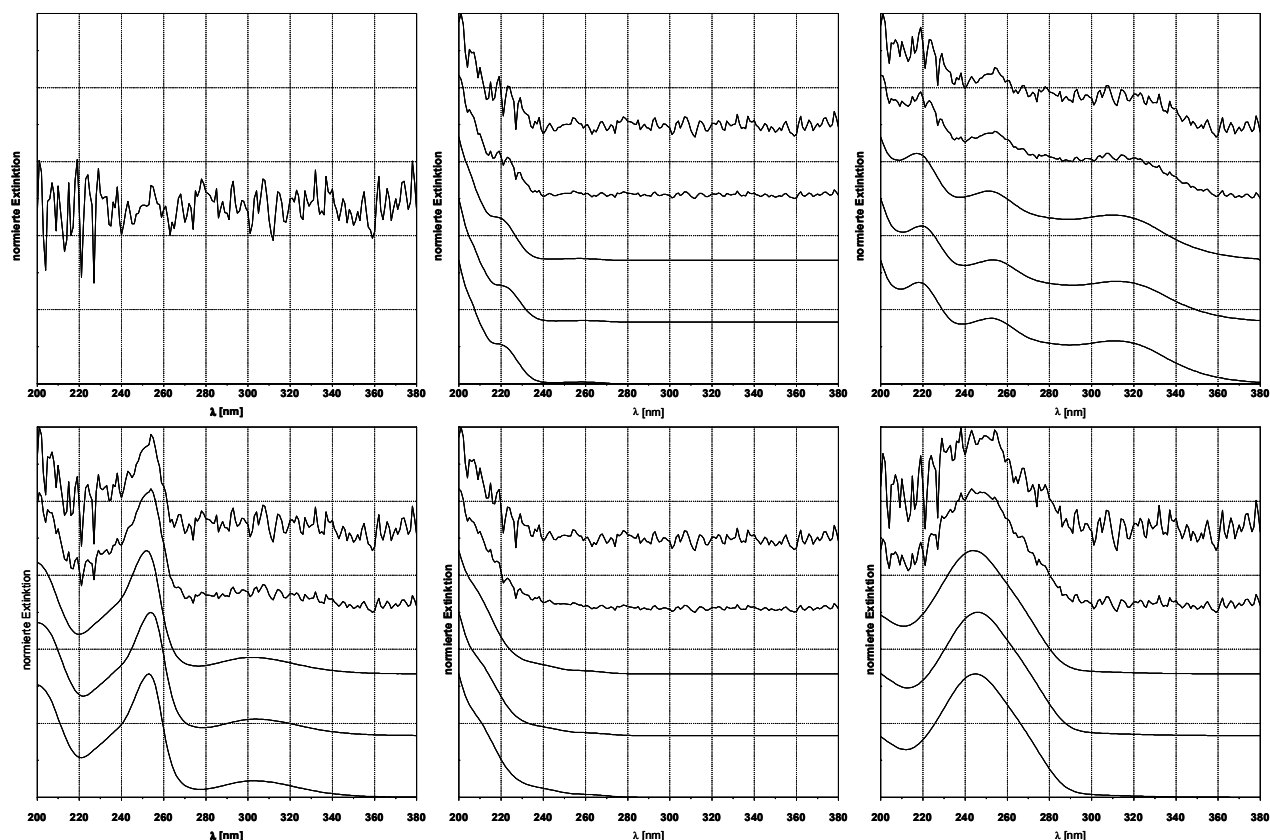


Abb. 25: Überlagerung durch Rauschen sowie batho- und hypsochrome Verschiebung der Spektren von Diphenhhydramin (oben Mitte), Flunitrazepam (oben rechts), Perazin (unten links), Phenobarbital (unten Mitte) und Prednisolon (unten rechts). Die Abbildung oben links zeigt das zur Überlagerung verwendete Rauschen. In den anderen Abbildungen sind jeweils dargestellt (von unten nach oben): das ursprüngliche, das um 1 nm bathochrom verschobene, das um 1 nm hypsochrom verschobene, das im Verhältnis 1:10 (Bereich der Bestimmungsgrenze) sowie das im Verhältnis 1:3 (Bereich der Nachweisgrenze) mit Rauschen überlagerte Spektrum.

Anschließend wurden die SI-Werte der veränderten Spektren in Bezug auf diejenigen aus reiner Lösung berechnet (Tab. 14).

Tab. 14: Übereinstimmung (SI-Werte) des reinen Spektrums mit den jeweils veränderten Spektren

Substanz	Diphenhydramin		Flunitrazepam	Perazin		Phenobarbital		Prednisolon	
Wellenlängenbereich / nm	200 - 380	200 - 240	200 - 380	200 - 380	200 - 280	200 - 380	200 - 280	200 - 380	200 - 300
Bereich Nachweisgrenze	0,9610	0,9799	0,9913	0,9316	0,9724	0,9222	0,9670	0,9396	0,9735
Bereich Bestimmungsgrenze	0,9954	0,9977	0,9992	0,9908	0,9965	0,9904	0,9962	0,9919	0,9966
Bathochromer Shift um 1 nm	0,9997	0,9997	0,9998	0,9983	0,9983	0,9999	0,9999	0,9995	0,9995
Hypsochromer Shift um 1 nm	0,9997	0,9997	0,9998	0,9983	0,9982	0,9999	0,9999	0,9995	0,9995

Tab. 14 zeigt deutlich, dass sich eine systematische Verschiebung des Spektrums um ± 1 nm in der Regel nicht gravierend auf den SI auswirkt: mit Ausnahme des Perazins wurden in allen Fällen SI-Werte $> 0,9990$ gefunden, eine Identifizierung wäre also nicht behindert worden. Perazin besitzt andererseits ein derart ausgeprägtes Spektrum, dass das Messergebnis bei visueller Kontrolle auch trotz eines SI von 0,9983 als identisch mit dem Referenzspektrum gewertet würde. Im übrigen ist eine solche Verschiebung aufgrund der außerordentlich genauen Wellenlängenkalibrierung der Detektoren ohnehin unwahrscheinlich. Bereits weiter oben (Abschnitt 2.2.3) wurde darauf hingewiesen, dass die Beschränkung des Spektrenvergleichs auf den Bereich relevanter Extinktion i. d. R. zu besseren Identifikationsergebnissen führt. Dies wird auch in Tab. 14 bestätigt, in der für vier der fünf untersuchten Wirkstoffe die SI-Werte für die wirklich relevanten Wellenlängenbereiche (vgl. Abb. 25) mitberechnet wurden. Die erhaltenen SI liegen für die mit Rauschen überlagerten Spektren - z. T. deutlich - höher als für den gesamten Messbereich (bei den verschobenen Spektren zeigte sich dagegen keine nennenswerte Verbesserung).

Während für den Bereich der geschätzten Nachweisgrenze (Überlagerung mit Rauschen im Verhältnis 1:3) eine Verringerung des SI bis hinunter auf 0,92 beobachtet wurde (0,97 bei angepasstem Wellenlängenbereich), sanken die Werte an der geschätzten Bestimmungsgrenze (Überlagerung mit Rauschen im Verhältnis 1:10) nur bis auf 0,990 (0,996).

Bei der Substanzidentifizierung im Bereich dieser analytischen Grenzwerte müssen also niedrigere Schwellenwerte angesetzt werden, wodurch die Zahl in Frage kommender Identifikationskandidaten deutlich erhöht wird. Im Bereich der Nachweisgrenze ist eine eindeutige Identifizierung daher vermutlich sehr viel seltener möglich. In der Praxis erweist sich bei stark verrauschten Spektren allerdings der visuelle Spektrenvergleich am Bildschirm des öfteren als dem SI überlegen. In die Software integrierte Glättungsalgorithmen sind zwar mit äußerster Zurückhaltung anzuwenden, können aber im Einzelfall die Identifizierung erheblich erleichtern.

Das für die obigen Berechnungen verwendete spektrale Rauschen (s. Abb. 25, oben links) kann als typisch für die verwendete HPLC-DAD-Anlage angesehen werden: im unteren Teil des Messbereiches steigt das Rauschen an, da dort einerseits die UV-Durchlässigkeit des Laufmittels allmählich abnimmt und andererseits das Emissionsspektrum der verwendeten Deuteriumlampe

an Energie verliert. Beides führt geräteseitig zu einer stärkeren Kompensation des Grundsignals und in der Folge zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis.

Aus den geschilderten Ergebnissen lassen sich zwei Schlussfolgerungen für die Festlegung geeigneter Schwellenwerte für den SI ziehen: im Falle sauberer Spektren ist die Verwendung von $SI > 0,9990$ akzeptabel, für den Fall einer Messung bei niedrigen Konzentrationen bis hinunter in den Bereich der Bestimmungsgrenze sollten SI-Schwellenwerte von 0,995 oder sogar 0,990 angesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher sämtliche in den folgenden Abschnitten vorgestellten Selektivitätsberechnungen für diese drei Schwellenwerte durchgeführt.

Im Falle einer realen Messung kann der Schwellenwert individuell bestimmt werden: hierzu muss lediglich ein für diese konkrete Messung typisches Rauschspektrum extrahiert werden, mit dem dann die in Abb. 25 bzw. Tab. 14 beschriebenen Berechnungen wiederholt werden.

Hartstra et al. [143] untersuchten ebenfalls die Überlagerung der UV-Spektren von zehn verschiedenen Wirkstoffen mit spektralem Rauschen, die nähere Vorgehensweise wird allerdings nicht genauer dargestellt. Das in einer Abbildung zu erkennende, verwendete Rauschen ist eher untypisch für einen Diodenarraydetektor. Die Autoren betrachteten als Ähnlichkeitsmaß neben dem SI auch den Korrelationskoeffizienten (Güte einer linearen Anpassung an die durch die Auftragung zweier Spektren gegeneinander resultierende Kurve) und fanden, dass ersterer bei verrauschten Spektren deutlich weniger beeinflusst wurde.

4.5.5 Ähnlichkeits- und Identifikationsmatrizen

Im Anschluss an die Festlegung der Kriterien für die Wertung unterscheidbar / nicht unterscheidbar wurden für jedes betrachtete Substanzpaar die Ähnlichkeitsmaße im Hinblick auf die RRT (nach dem oben beschriebenen Fensteransatz) und das UV-Spektrum (SI) berechnet. Die Ergebnisse wurden in umfangreichen Tabellen, sog. Ähnlichkeitsmatrizen, gespeichert. Das weitere, für die vorliegende Arbeit entwickelte Vorgehen soll im folgenden kurz beschrieben werden.

Im Falle der UV-Spektren wurde für m Substanzen eine Ähnlichkeitsmatrix in der folgenden Form erhalten:

$$\begin{array}{ccccc}
 & \textit{Substanz 1} & \textit{Substanz 2} & \dots & \textit{Substanz n} \\
 \textit{Substanz 1} & SI_{11} & SI_{12} & \dots & SI_{1m} \\
 \textit{Substanz 2} & SI_{21} & SI_{22} & \dots & SI_{2m} \\
 \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots \\
 \textit{Substanz m} & SI_{m1} & SI_{m2} & \dots & SI_{mm}
 \end{array} \quad (22)$$

mit $SI_{ii} = 1,0000$ und $SI_{ik} = SI_{ki}$. Wendet man den festgelegten Schwellenwert an, bei dessen Überschreitung zwei Spektren als identisch gewertet werden, kann man die SI-Werte durch die Zahlen Null (unterscheidbar) und Eins (nicht unterscheidbar) ersetzen, Gl. (22) erhält dann das folgende Aussehen:

$$\begin{array}{ccccc}
& \text{Substanz 1} & \text{Substanz 2} & \dots & \text{Substanz } m \\
\text{Substanz 1} & 1 & 0 & \dots & 0 \\
\text{Substanz 2} & 0 & 1 & \dots & 1 \\
\vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\
\text{Substanz } m & 0 & 1 & \dots & 1
\end{array} \quad (23)$$

Im Beispiel von Gl. (23) wären also die Spektren von Substanz 2 und Substanz m als identisch zu werten, diejenigen von Substanz 1 und Substanz 2 hingegen nicht. Gl. (23) soll im folgenden als "Identifikationsmatrix" bezeichnet werden. Je höher der Schwellenwert festgelegt wird, desto weniger Substanzen werden als identisch gewertet. Dies verdeutlicht auch Abb. 26, die einen Ausschnitt aus einer im Rahmen dieser Arbeit berechneten Ähnlichkeitsmatrix zeigt.

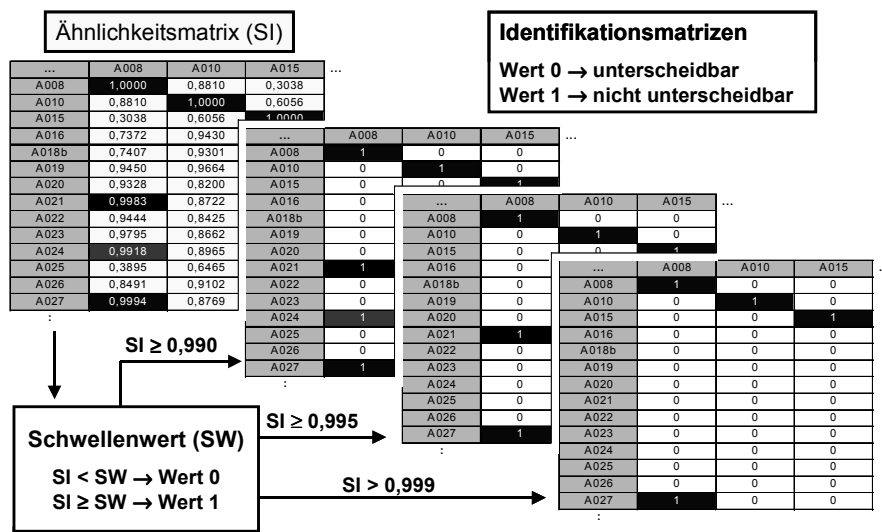


Abb. 26: Umwandlung der Ähnlichkeitsmatrix in Identifikationsmatrizen in Abhängigkeit vom Schwellenwert.

Analog konnte für die betrachteten Substanzen zunächst eine Ähnlichkeitsmatrix der RRT-Differenzen aufgestellt werden, die dann auf der Grundlage des "Fensteransatzes" (vgl. Abschnitt 2.2.2) in eine Identifikationsmatrix umgewandelt werden konnte (aus praktischen Gründen erfolgte die Berechnung der RRT-Identifikationsmatrix allerdings tatsächlich in einem Schritt). Nach der Berechnung der einzelnen Identifikationsmatrizen wurde schließlich für die Kombination von RRT und UV-Spektrum eine "kombinierte Identifikationsmatrix" K eingeführt:

$$K = \begin{pmatrix} K_{11} & K_{12} & \dots & K_{1m} \\ K_{21} & K_{22} & \dots & K_{2m} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ K_{m1} & K_{m2} & \dots & K_{mm} \end{pmatrix} \text{ mit } K_{ik} = \begin{cases} 0 & \text{für unterscheidbare Paare} \\ 1 & \text{für nicht unterscheidbare Paare} \end{cases} \quad (24)$$

Hierfür wurden die korrespondierenden Felder der beiden einzelnen Identifikationsmatrizen miteinander multipliziert, so dass in K nur solche Substanzpaare den Wert Eins erhielten, bei denen bezüglich beider Parameter Identität festgestellt wurde. Dieser Vorgang wird noch einmal

in Abb. 27, wiederum an Ausschnitten aus den berechneten Matrizen, dargestellt.

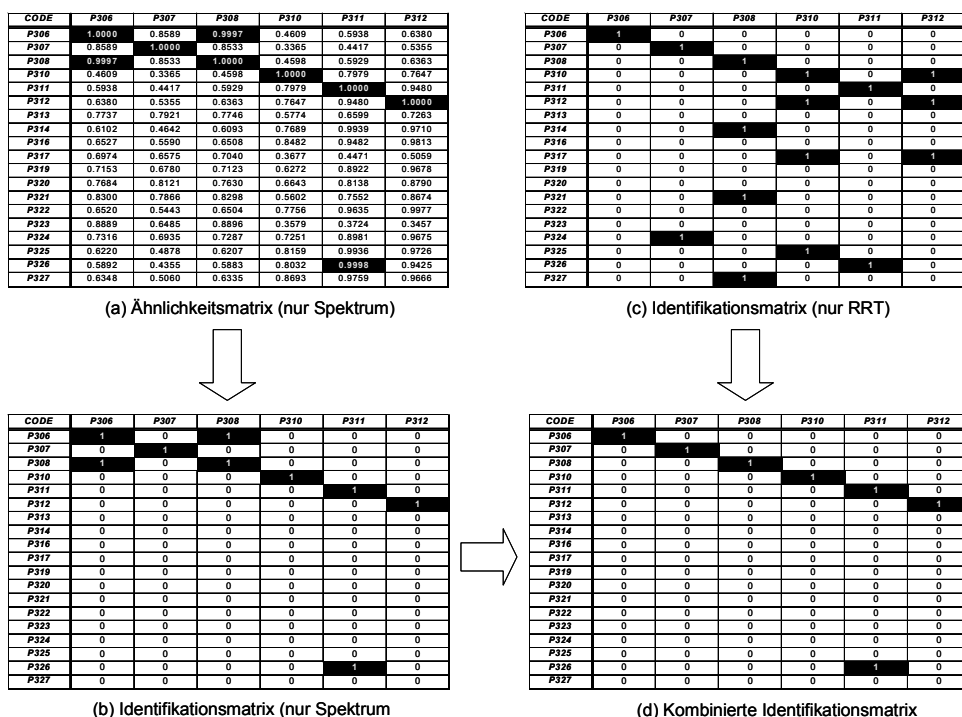


Abb. 27: Berechnung der kombinierten Identifikationsmatrix auf der Grundlage von RRT und UV-Spektrum. Sie wird durch Multiplizieren der korrespondierenden Felder der beiden einzelnen Identifikationsmatrizen erhalten. Bei den angegebenen Substanzkürzeln handelt es sich um die interne Codierung der Spektrenbibliothek.

K zeigt starke Parallelen zur Kaiserschen Kalibriermatrix. Hier wie dort enthält die Hauptdiagonale den "richtigen" Messwert, und in beiden Fällen enthalten die restlichen Felder einer Matrixzeile Information darüber, inwiefern die Bestimmung eines Analyten durch die anderen gestört werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Ähnlichkeitsmatrizen mit bis zu $2.682 \times 2.682 = 7.193.124$ Substanzpaaren berechnet. Da dies die Kapazitäten einfacherer Desktopprogramme wie MS Excel [213] oder SPSS [214] überfordert hätte, wurde eine eigene Programmroutine für die speziell für Matrizenrechnung entwickelte Software MatLab ([215], s. Abschnitt 3.6) geschrieben. Die resultierenden Matrizen wurden in MS-Excel-gerechte Teilstücke < 256 Spalten geteilt und dort ausgezählt.

Die vorstehend geschilderten Berechnungen wurden auf der Basis der UV-Spektren zunächst für die gesamte Bibliothek bzw. im Falle der Identifikationsmatrizen mit RRT-Beteiligung getrennt nach Laufmittel A und B durchgeführt. Dabei wurden sämtliche Kombinationsmöglichkeiten der beiden in Abschnitt 4.5.3 erläuterten 68,3 % - bzw. 95,4 % - RRT - Fenster mit den drei SI-Schwellenwerten 0,9900, 0,9950 und 0,9990 durchgerechnet. Zusätzlich wurde jedoch auch untersucht, inwiefern die betrachteten Selektivitätsparameter sich veränderten, wenn strukturell homogenere Substanzkollektive untersucht wurden. Hierzu wurden die genannten Berechnungen auch für zwei Untergruppen der Spektrenbibliothek durchgeführt: zum einen für alle Substanzen, die einen ein- oder mehrfachsubstituierten Phenylchromophor (als alleinigen Chromophor) enthielten, zum anderen für Verbindungen mit genau einem lediglich einfachsubstituierten

Phenylchromophor. Die Strukturformeln für beide Substanzklassen sind in Abb. 28 wiedergegeben.

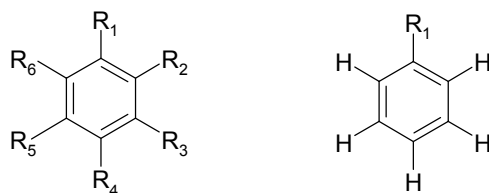


Abb. 28: Strukturformeln für die Substanzgruppen mit einem ein- oder mehrfachsubstituierten (links) bzw. lediglich einfachsubstituierten Phenylchromophor. Die Reste R dürfen keine weiteren isolierten Chromophore oder mit dem Phenylsystem in Konjugation stehende Doppelbindungen enthalten.

Einen Überblick über alle berechneten Ähnlichkeitsmatrizen gibt Tab. 15. Eine vollständige Liste der in der Spektrenbibliothek enthaltenen Substanzen findet sich in [7]. Die Listen der Wirkstoffe mit ein- oder mehrfachsubstituiertem bzw. nur einfachsubstituiertem Phenylchromophor finden sich im Anhang im Abschnitt 9.2.

Tab. 15: Übersicht über die berechneten Ähnlichkeitsmatrizen

Daten	Basis der Ähnlichkeitsermittlung	Zahl der Substanzen (n)
Gesamte Spektrenbibliothek	Spektrum	2.682
Gesamte Spektrenbibliothek, in Eluent A gemessene Substanzen	Spektrum	1.993
	RRT	1.993
	Spektrum + RRT	1.993
Gesamte Spektrenbibliothek, in Eluent B gemessene Substanzen	Spektrum	689
	RRT	677 ¹
	Spektrum + RRT	677 ¹
Wirkstoffe mit substituiertem Phenylchromophor	Spektrum	382
	Feinstruktur ²	382
In El. A gemessene Wirkstoffe mit substituiertem Phenylchromophor	Spektrum	316
	Feinstruktur ²	316
	RRT	316
	Spektrum + RRT	316
	Feinstruktur ² + RRT	316
In El. B gemessene Wirkstoffe mit substituiertem Phenylchromophor	Spektrum	66
	Feinstruktur ²	66
	RRT	65 ³
	Spektrum + RRT	65 ³
	Feinstruktur ² + RRT	65 ³
Wirkstoffe mit einfachsubstituiertem Phenylchromophor	Spektrum	139
	Feinstruktur ²	139

Fortsetzung Tab. 15

Daten	Basis der Ähnlichkeitsermittlung	Zahl der Substanzen (n)
In El. A gemessene Wirkstoffe mit einfachsubstituiertem Phenylchromophor	Spektrum	125
	Feinstruktur ²	125
	RRT	125
	Spektrum + RRT	125
	Feinstruktur ² + RRT	125
In El. B gemessene Wirkstoffe mit einfachsubstituiertem Phenylchromophor	Spektrum	14
	Feinstruktur ²	14
	RRT	14
	Spektrum + RRT	14
	Feinstruktur ² + RRT	14

¹ Die Differenz erklärt sich durch Auslassen von zwölf Verbindungen mit unbekannter $RT_i > 60$ min in El. B.

² Gemeint ist der Spektralbereich von 230 – 290 nm (vgl. Abb. 16).

³ Die Differenz erklärt sich durch Auslassen einer Verbindung mit unbekannter $RT_i > 60$ min in El. B.

4.5.6 Ableitung der mittleren Selektivität XM

Aufgrund einiger im Laufe der vorliegenden Arbeit auffällig gewordener Schwächen der in der Literatur beschriebenen und in Abschnitt 2.4.2 vorgestellten Selektivitätsparameter wurde aus der Definition der Selektivität nach Kaiser eine weitere Kenngröße abgeleitet. Hierzu galt es zunächst, den Kaiserschen Ansatz (s. Abschnitt 2.3.3) von der quantitativen Gehaltsbestimmung auf die qualitative Identifizierung zu übertragen.

Folgende Festlegungen wurden getroffen: als "richtig positives" Ergebnis wurde die korrekte Identifizierung eines Analyten verstanden, als "falsch positiv" die fälschliche Wertung eines Substanzpaares als identisch. "Richtig negativ" wären die korrekt als nicht identisch eingestuft Paare unterschiedlicher Substanzen, während "falsch negative" Ergebnisse nicht auftreten konnten, da jede Substanz immer als identisch mit sich selbst gewertet wurde (für das RRT-Fenster mit $z = 2$ gilt dies allerdings nur in 95,4 % der Fälle).

In Gl. (6), S. 29 wurde für den Fall einer quantitativen Gehaltsbestimmung der Wert der Hauptdiagonalen der "Kalibriermatrix", also hier der richtig positive Wert, zum Ausmaß der Störung durch die Summe der falsch positiven Messwerte der entsprechenden Matrixzeile ins Verhältnis gesetzt. Anders als bei der quantitativen Analyse können letztere bei der Identifizierung nach dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Schema nur den Wert Eins annehmen, doch stört das die Übertragbarkeit der Formel grundsätzlich nicht. Die partiellen Selektivitäten richtig negativer Werte, also solche, die im Kaiserschen Modell die Bestimmung des Analyten nicht störten, trugen dort ebenfalls den Wert Null und gingen somit nicht in die Summe im Nenner von Gl. (6) ein. Übertragen auf die kombinierte Identifikationsmatrix besäße der in Gl. (6) in eckige Klammern gefasste Term zunächst die folgende Form:

$$\Xi_i = \left[\frac{\text{Min}_{i=1..n} \frac{|\kappa_{ii}|}{\left(\sum_{j=1}^n |\kappa_{ij}| \right) - |\kappa_{ii}|}} \right] = \left[\frac{\text{Min}_{i=1..n} \frac{1}{\left(\sum_{j=1}^n |\kappa_{ij}| \right) - 1}} \right] \quad (25)$$

Da nur $|\kappa_{ij}|$ mit dem Wert Eins in die Summe im Nenner von Gl. (25) eingehen, gilt mit $u_i =$ Summe der von der Substanz i nicht unterscheidbaren Substanzen einschließlich ihrer selbst (also die Summe aller Matrixelemente der Zeile i mit $\kappa_{ij} = 1$):

$$\Xi_i = \left[\frac{\text{Min}_{i=1..n} \frac{1}{(u_i - 1)}} \right] \quad (26)$$

Da u_i von 1 bis maximal n läuft, geht Ξ_i von $[1/(n-1)]$ bis Unendlich. Es muss also, analog zur Subtraktion von Eins in Gl. (6), ein Korrekturterm subtrahiert werden, wenn Ξ_i von Null bis Unendlich laufen soll:

$$\Xi_i = \left[\frac{\text{Min}_{i=1..n} \frac{1}{(u_i - 1)}} \right] - \frac{1}{(n-1)} \quad (27)$$

Alternativ dazu, wie in Gl. (6) die Selektivität eines Verfahrens über die unselektivste Messgröße bzw. wie in Gl. (27) über die am schlechtesten identifizierbare Komponente zu definieren, scheint es sinnvoller, einen Mittelwert über alle n Substanzen zu bilden, also eine mittlere Selektivität XM zu berechnen¹. Man erhält dann:

$$XM = \frac{1}{\left(\left(\sum_{i=1}^n u_i \right) / n \right) - 1} - \frac{1}{n-1} = \frac{n}{\left(\sum_{i=1}^n u_i \right) - n} - \frac{1}{n-1} = \frac{n}{u - n} - \frac{1}{n-1} \quad (28)$$

mit $u = \left(\sum_{i=1}^n u_i \right)$ = Anzahl aller identisch gewerteten Paare aus der gesamten Matrix. Die Zahl n der insgesamt betrachteten Substanzen ist bekannt und u kann durch eine Häufigkeitsanalyse der kombinierten Identifikationsmatrix rechnergestützt leicht ausgezählt werden. Verbindet man Gl. (28) mit den Gl. (11) und (12), S. 34, so besteht zwischen XM , der Mean List Length MLL und der Discriminating Power DP der folgende Zusammenhang:

$$XM = \frac{1}{MLL - 1} - \frac{1}{n - 1} = \frac{DP}{(n - 1)(1 - DP)} \quad (29)$$

4.5.7 Vergleichende Bewertung der Selektivitätsparameter

Akkerboom et al. [140], die anscheinend als erste 1980 die Identification Power für verschiedene TLC-Systeme berechneten, stellten bald fest, dass das IP-Konzept (vgl. Abschnitt 2.4.2) zur

¹ Die konsequente griechische Schreibweise Ξ wurde hier zugunsten besserer Les- und Schreibbarkeit in XM geändert.

Charakterisierung weniger selektiver Analysenverfahren eher ungeeignet war. So fanden auch Schepers et al. [172] für die damals untersuchten TLC-Methoden so niedrige IP-Werte, dass ihnen ein Methodenvergleich auf dieser Basis nicht sinnvoll erschien (sie entwickelten daraufhin das MLL-Konzept).

Bezogen auf moderne, hochselektive Analysenverfahren trifft diese Feststellung so nicht mehr zu: mit diesen kann ein z. T. durchaus nennenswerter Anteil des betrachteten Substanzkollektivs eindeutig bestimmt werden. Unklar bleibt allerdings, warum die Autoren des IP-Konzeptes bei ihrem Vorgehen einen wichtigen Gesichtspunkt unberücksichtigt ließen: dass nämlich eine Methode, die von 200 Substanzen 100 (und damit 50 %) eindeutig identifizieren kann, u. U. als leistungsfähiger zu bewerten ist als ein Verfahren, welches die gleiche Anzahl von Wirkstoffen aus einer Menge von 1.000 und damit nur 10 % der Verbindungen eindeutig identifiziert. Daher schien es erforderlich, einen Bezug zur Anzahl n der untersuchten Substanzen herzustellen. Zu diesem Zweck soll die "Relative Identification Power" (RIP) eingeführt werden:

$$RIP = \frac{IP}{n} \times 100 \% \quad (30)$$

Nachfolgend soll die Frage diskutiert werden, welcher der beschriebenen Selektivitätsparameter (RIP, MLL, DP und XM) als am besten für den Vergleich der Methodenselektivität geeignet eingeschätzt wurde. Hierfür wurden zunächst Kriterien (s. u.) formuliert, anschließend wurde deren Einhaltung durch die Kenngrößen überprüft. Die RIP wurde hierbei ausgeklammert, da der Blickwinkel allein auf die eindeutig identifizierten Substanzen zu eng erschien. Sie wurde aber als in jedem Fall interessante Zusatzinformation gesehen und daher bei den in Abschnitt 4.5.9 dargestellten Ergebnissen der Selektivitätsberechnungen ebenfalls angegeben.

Wie schon weiter oben beschrieben, wird Selektivität nach Kaiser durch das Ausmaß gekennzeichnet, in dem die korrekte chemisch-analytische Bestimmung einer Substanz durch falsche Messergebnisse anderer Substanzen beeinträchtigt wird. In der vorliegenden Arbeit wird die Identifizierung einer Substanz vor allem durch falsch positive Messergebnisse anderer Substanzen gestört. Falsch negative Befunde wurden dagegen als eher unproblematisch eingeschätzt, wenn die Substanzidentifizierung mit dem Spektrum beginnt. Sofern dieses nicht durch Rauschen oder Überlagerungen verfälscht vorliegt (dies kann durch die Wahl eines geeigneten Schwellenwertes für den SI berücksichtigt werden, vgl. Abschnitt 4.5.4), ist hier ein falsch negatives Ergebnis auszuschließen. Zwar bestünde bei strikter Anwendung des in dieser Arbeit gewählten RRT-Fensters von 2 s immerhin eine Wahrscheinlichkeit von 4,6 % für ein falsch negatives Resultat, im Zweifelsfall würde jedoch eine Nachmessung der vermuteten Substanz dieses Dilemma aufheben.

Als eigentlich interessante Kenngröße für die Methodenselektivität wurde demzufolge das Verhältnis der Anzahl falsch positiver Substanzpaare zur Gesamtzahl möglicher Paare angesehen. Erstere wurde durch Subtraktion der n korrekt identifizierten Paare von den u insgesamt als ununterscheidbar gewerteten erhalten, letztere war durch die Anzahl aller $n \times n = n^2$ Paare der Identifikationsmatrix gegeben. Das Verhältnis falsch positiver Paare zur Gesamtzahl der möglichen Paare konnte demnach folgendermaßen ausgedrückt werden:

$$a = \frac{u - n}{n^2} \quad (31)$$

Es war dann zunächst zu fordern, dass ein geeigneter Selektivitätsparameter den gesamten Bereich von a mit ausreichender Auflösung darstellen sollte (**Kriterium 1**).

Die strukturelle Vielfalt organischer Wirkstoffe ist groß, aber endlich. Je mehr Substanzen mit einer Messmethode erfasst werden können, desto größer dürfte die Wahrscheinlichkeit sein, dass beispielsweise der Chromophor einer neu hinzugekommen Substanz bereits in einer Spektrenbibliothek vorkommt. Die Wahrscheinlichkeit, dass die neue Substanz als identisch mit einer bereits vorhandenen gewertet würde, steigt demnach mit wachsendem n . Demzufolge sollte beim Vergleich zweier Methoden mit gleichem a diejenige mit größerem n als selektiver bewertet werden (**Kriterium 2**).

Kaiser ging in seiner Arbeit von Methoden aus, bei denen nur geringe Störungen der Substanzbestimmung vorlagen (denn: "... bei Werten von Ξ , die nur etwas über Null liegen, kann man praktisch nicht mehr von Selektivität sprechen.",[159]). Sollen analog Methoden für die STA verglichen werden, die bereits einen hohen Grad an Eindeutigkeit der Identifizierung gewährleisten, so erscheint es wenig sinnvoll, den Bereich großer Werte für u heranzuziehen. Definiert man die Anzahl falsch positiver Substanzpaare (einfach gezählt) als

$$b = \frac{u - n}{2} \quad (32)$$

dann sollte der verwendete Selektivitätsparameter besonders den Bereich kleiner b gut auflösen in dem Sinne, dass sich möglichst jedes zusätzliche falsch positive Substanzpaar in einer wahrnehmbaren Änderung des Parameters niederschlägt (**Kriterium 3**). Für den Vergleich schlechterer Methoden wäre dagegen eine gleichmäßig gute Auflösung über den gesamten Bereich von b wünschenswert. In Tab. 16 werden die drei Selektivitätsparameter MLL, DP und XM als Funktion von a bzw. b dargestellt.

Tab. 16: Darstellung der Selektivitätsparameter als Funktion des Verhältnisses a falsch positiv identifizierter Substanzpaare zu allen möglichen Paaren, bzw. der Anzahl b falsch positiver Paare (einfach gezählt).

Parameter	als $f(a)$, s. Gl. (31)	als $f(b)$, s. Gl. (32)
MLL	$n \times a + 1$ (33)	$\left(\frac{2}{n}\right) \times b + 1$ (36)
DP	$-\left(\frac{n}{n-1}\right) \times a + 1$ (34)	$-\left(\frac{2}{n \times (n-1)}\right) \times b + 1$ (37)
XM	$\left(\frac{1}{n}\right) \times \frac{1}{a} - \left(\frac{1}{n-1}\right)$ (35)	$2 \times n \times \frac{1}{b} - \left(\frac{1}{n-1}\right)$ (38)

Im folgenden sollen diese Abhängigkeiten graphisch verdeutlicht werden.

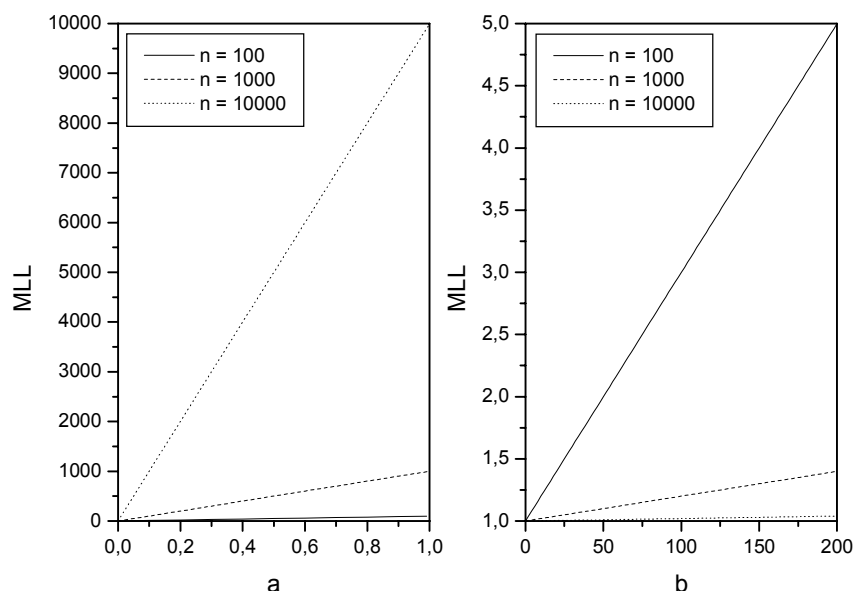


Abb. 29: Abhängigkeit der MLL von a und b für verschieden große Substanzzahlen n. Während der vollständige Bereich von a abgebildet wurde, wurde für b nur der Bereich zwischen 0 und 200 falsch positiven Paaren dargestellt.

In Abb. 29 ist der Verlauf der Mean List Length MLL in Abhängigkeit von a bzw. b für verschieden große n (Zahl der Substanzen) dargestellt. Kriterium 1, die geforderte gute Auflösung über den gesamten Bereich von a, ist erfüllt (die nur scheinbar schlechte Auflösung für n = 100 resultiert aus dem Abbildungsmaßstab). Kriterium 2, ein größerer Selektivitätswert (also ein kleinerer Wert für die MLL) für große n bei jeweils gleichem a ist dagegen nicht erfüllt. Kriterium 3, die Auflösung im Bereich kleiner b, ist akzeptabel, wird für große n allerdings deutlich schlechter (die MLL-Werte der abgebildeten Geraden für n = 10.000 entsprechen einem Bereich von 1,0 bis 1,02).

Der größte Vorteil der MLL liegt in ihrer direkten Anschaulichkeit: MLL-1 gibt die Zahl derjenigen anderen Substanzen an, mit denen eine Verbindung im Mittel verwechselt werden könnte. Nachteilig sind der fehlende Bezug auf n sowie die Tatsache, dass die "List Length" immer auch die Substanz selbst enthält. Beides könnte umgangen werden, wenn statt MLL a selbst als Güteparameter verwendet würde (denn $a = (MLL - 1) / n$). Man kann aber zeigen, dass $a = (2b / n^2)$ für größere n in b selber schlecht auflöst und damit Kriterium 3 ebenfalls nicht erfüllt.

Ein wichtiger Aspekt der Mean List Length wurde in der zu diesem Parameter publizierten Literatur bisher außer Acht gelassen: bei der MLL handelt es sich ja um nichts anderes als den statistischen Mittelwert der "Listenlängen" der einzelnen Substanzen. Zur vollständigen Charakterisierung gehört daher eigentlich auch ein Bild von der Verteilung der Werte um diesen Mittelwert herum. Hierbei spricht nichts gegen die Annahme, dass für eine hinreichend große Anzahl untersuchter Substanzen die gefundenen Listenlängen einer nach links beim Wert Eins abgeschnittenen Normalverteilung (truncated normal distribution) folgen sollten, so dass mindestens die Angabe der Standardabweichung sowie der Minimal- und Maximalwerte (Spannweite) wünschenswert erscheint.

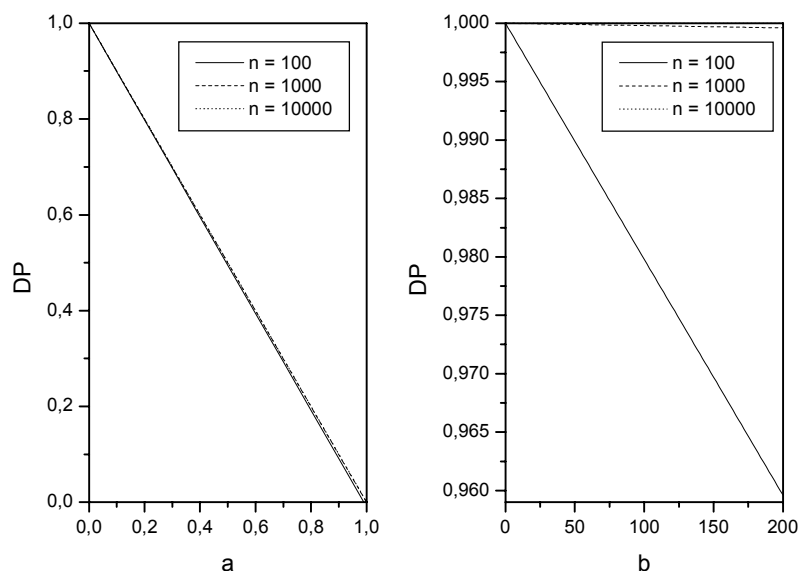


Abb. 30: Abhängigkeit der DP von a und b für verschieden große Substanzzahlen n

Abb. 30 zeigt die Darstellung der Abhängigkeit der Discriminating Power DP von den Parametern a und b. Die Auflösung über a (Kriterium 1) ist ebenfalls gleichmäßig gut erfüllt. Für größere n bei gleichem a ist der Parameter nur minimal erhöht, Kriterium 2 ist also besser erfüllt als bei der MLL. Dies bedeutet, dass die DP besser geeignet erscheint, die Selektivität von Methoden zu vergleichen, bei denen unterschiedlich große Substanzzahlen betrachtet wurden.

Die Auflösung in b (Kriterium 3) ist dagegen gering und wird mit zunehmendem n immer schlechter. So führt ein Unterschied von 200 Substanzpaaren bei $n = 1.000$ nur zu einer Änderung in der vierten Nachkommastelle, für $n = 10.000$ sogar nur um $\text{ca. } 2 \times 10^{-6}$. Aus der entsprechenden Gleichung für $DP = f(b)$ in Tab. 16 ist ersichtlich, dass für eine DP von 0,900 das Verhältnis von b (einfach gezählte ununterscheidbare Paare ohne Hauptdiagonale der Identifikationsmatrix) zu $[n \times (n-1)]/2$ (einfach gezählte Anzahl aller möglichen Paare ohne Hauptdiagonale der Identifikationsmatrix) 0,1 betragen müsste. Für $n = 1.000$ würde demnach eine DP von 0,9 einem Wert von 49.950 falsch positiven Substanzpaaren entsprechen. Für $n = 10.000$ wären es sogar knapp 5×10^6 falsch positive Paare (von knapp 5×10^7 möglichen). Für den Vergleich hochselektiver Methoden erscheint dieser Parameter daher ungeeignet.

Die Darstellung für die aus der Kaiserschen Formel abgeleitete mittlere Selektivität XM (Abb. 31) zeigt zunächst eine schlechte Auflösung über den größten Teil von a. Kriterium 1 ist somit ebenso wenig erfüllt wie Kriterium 2, denn auch hier resultieren bei gleichem a schlechtere Selektivitätswerte für höhere n. Allerdings wird die Forderung nach guter Auflösung bei kleinen b (Kriterium 3) sehr viel besser erfüllt als bei den anderen beiden Parametern, sie nimmt sogar mit wachsendem n noch zu. Dieser Parameter scheint also insbesondere für den Vergleich hochselektiver Verfahren geeignet zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass offenbar keiner der betrachteten Parameter allen Anforderungen, die sich aus den verschiedenen Aspekten der Selektivität ergeben, genügen kann. Für den Vergleich hochselektiver Verfahren scheinen MLL und XM besser geeignet zu sein, während die DP den gesamten Selektivitätsbereich besser abdeckt. Daher sollte im

konkreten Fall eines Methodenvergleichs zunächst zur groben Einordnung die DP herangezogen werden. Bei Werten nahe Eins sollte auf jeden Fall XM zur besseren Auflösung herangezogen werden, sofern vergleichbare Substanzzahlen untersucht wurden.

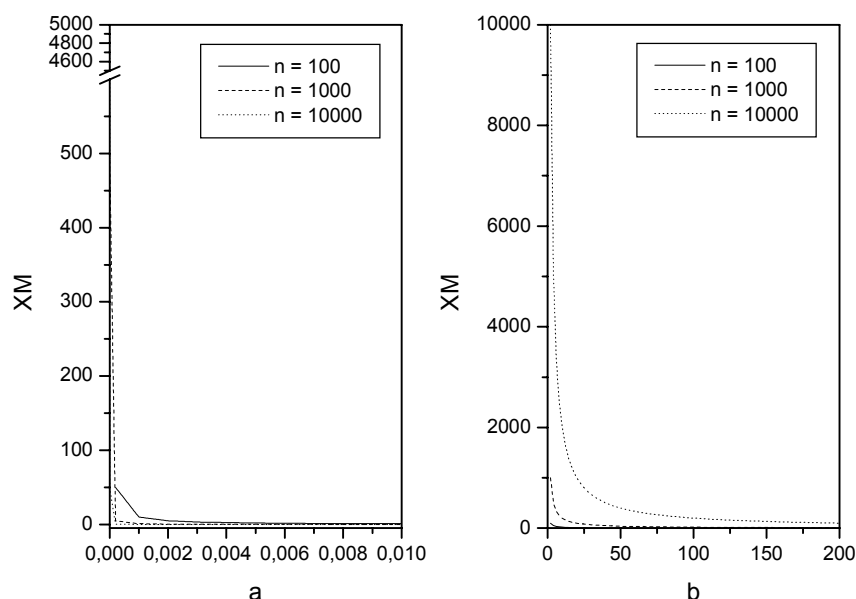


Abb. 31: Abhängigkeit von XM von a und b für verschieden große Substanzzahlen n. In dieser Abbildung wurde für a nur der Bereich bis 0,01 dargestellt, da in der Darstellung bis Eins die Kurven nicht mehr zu erkennen gewesen wären.

Die MLL oder vielleicht besser der hier eingeführte Parameter a besitzen als zusätzliche Qualitätsmerkmale die größere anschauliche Bedeutung. Der prozentuelle Anteil eindeutig identifizierter Substanzen, die RIP, kann das Bild abrunden. Des weiteren sollte für eine korrektere Einschätzung, wenn möglich, nicht nur die mittlere Listenlänge, sondern auch die Verteilung der Listenlängen betrachtet und mindestens in Form von Standardabweichung und Spannweite beschrieben werden.

Durch die beschriebenen Parameter kann die Selektivität zwar zahlenmäßig erfasst werden, die Frage der toxikologischen Relevanz der Ergebnisse (möglicherweise weisen gerade die wichtigsten Substanzen die größten LL-Werte auf) kann durch sie dagegen nicht beantwortet werden. Angesichts der relativ großen Anzahl für die STA besonders relevanter Wirkstoffe (vgl. Abschnitt 4.1.1) sollten sich die Listenlängen für diese jedoch annähernd so verteilen wie für den gesamten Substanzbestand.

4.5.8 Ergebnisse aus der Literatur

Als Orientierung für die Bewertung der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse werden in Tab. 17 die in der Literatur gefundenen Werte für DP und MLL aufgeführt. Wenn sowohl DP als auch MLL als Originaldaten angegeben waren, traten zum Teil widersprüchliche Werte auf; in diesen Fällen wurden die Parameter meist auf unterschiedlicher Grundlage ermittelt. XM wurde in allen Fällen mit Hilfe von Gl. (29), S. 90 über die DP berechnet.

Tab. 17: Literaturwerte für DP und MLL. Die grau unterlegten Felder wurden aus den entsprechenden Daten über Gl. (13), S. 35 und Gl. (29), S. 90 berechnet. Die Erklärung der Abkürzungen für die Messmethoden findet sich am Ende der Tabelle. n = Anzahl der jeweils betrachteten Substanzen.

Nr.	Quelle	Art der Substanzen	n	Analysenmethode(n) ¹	DP	MLL	XM
1	[118]	Barbiturate	25	CZE	0,8230	3,40	0,1937
2			25	MEKC	0,9730	1,40	1,5015
3			25	CZE + MEKC	0,9900	1,16	4,1250
4	[93]	Basische Medikamente und Drogen	50	HPTLC, 1-dimensional	0,8980	6,00	0,1797
5			50	HPTLC, 2-dimensional	0,9900	1,49	2,0204
6			50	GC-MS	0,9800	1,98	1,0000
7	[142]	Medikamente und Metabolite	244	GC-MS (Ion Trap)	0,9997	1,07	13,7133
8	[100]	Medikamente und Drogen	372	HPLC (RI)	0,8400	36,28	0,0142
9			372	HPLC-DAD	0,8040	36,45	0,0111
10			372	HPLC-DAD + RI	0,9930	5,39	0,3824
11		Saure Medikamentwirkstoffe	56	TLC	0,6970	9,13	0,0418
12			56	GC (RI)	0,8550	3,96	0,1072
13			56	DAD	0,6360	9,46	0,0318
14			56	GC (RI) + DAD	0,9640	1,63	0,4869
15			56	HPLC (RI)	0,7470	8,38	0,0537
16			56	HPLC-DAD	0,5340	11,41	0,0208
17			56	HPLC-DAD + RI	0,9640	3,38	0,4869
18		Basische Medikamente und Drogen	76	TLC	0,6640	11,13	0,0263
19			76	GC (RI)	0,8560	5,46	0,0793
20			76	DAD	0,7810	8,30	0,0475
21			76	GC (RI) + DAD	0,9730	1,64	0,4805
22			76	HPLC (RI)	0,7480	11,07	0,0396
23			76	HPLC-DAD	0,7600	8,54	0,0422
24			76	HPLC-DAD + RI	0,9700	2,32	0,4311
25	[91]	Basische Medikamente und Drogen	100	TLC-System 1	0,8390	16,94	0,0526
26			100	TLC-System 2	0,8370	17,14	0,0519
27			100	TLC-System 3	0,8630	14,56	0,0636
28			100	TLC-System 4	0,8130	19,51	0,0439
29			100	TLC-System 5	0,8080	20,01	0,0425
30			100	TLC-System 6	0,8620	14,66	0,0631
31			100	TLC-System 7	0,8670	14,17	0,0658
32			100	TLC-System 8	0,6610	34,56	0,0197
33			100	2 TLC-Systeme, max.	0,9290	8,03	0,1322
34			100	3 TLC-Systeme, max.	0,9790	3,08	0,4709
35			100	4 TLC-Systeme, max.	0,9930	1,69	1,4329
36	[172]	Basische Medikamente und Drogen	100	GC + TLC	0,9984	1,16	6,2399

Fortsetzung Tab. 17

Nr.	Quelle	Art der Substanzen	n	Analysenmethode(n) ¹	DP	MLL	XM
37	[166]	Toxikologisch relevante Substanzen nach [120]	620	UV (Maxima) + GC + TLC	0,9990	1,29	1,5822
38	[108]	Basische und neutrale Wirkstoffe	99	TLC-System 1	0,8102	19,60	0,0436
39			99	TLC-System 2	0,8664	14,09	0,0662
40			99	TLC-System 3	0,7845	22,12	0,0371
41			99	GC	0,9367	7,20	0,1511
42			99	HPLC	0,9102	9,80	0,1034
43			99	CC 1 (Farbreaktion)	0,8572	14,99	0,0613
44			99	CC 2	0,8433	16,36	0,0549
45			99	CC 3	0,8510	15,60	0,0583
46			99	MS	0,9959	1,40	2,4898
47			99	DAD	0,9068	10,13	0,0993
48			99	TLC-System 1 + CC	0,9137	9,46	0,1080
49			99	TLC-System 2 + CC	0,9326	7,61	0,1411
50			99	TLC-System 3 + CC	0,9094	9,88	0,1024
51			99	GC-MS	0,9990	1,10	9,9898
52			99	HPLC-DAD	0,9743	3,52	0,3866
53			99	GC-MS + TLC	0,9995	1,05	19,9898
54			99	HPLC-DAD + TLC	0,9980	1,20	4,9898
55			99	GC-MS + HPLC-DAD	0,9998	1,02	49,9898
56			99	GC-MS + HPLC-DAD + TLC	1,0000	1,00	∞

¹ CZE: Kapillarzonenelktrophorese, MEKC: Mizellare elektrokinetische Chromatographie, HPTLC: Hochleistungsdünnschichtchromatographie, GC-MS: (Kapillar-)Gaschromatographie mit massensensitiver Detektion, HPLC: Hochleistungsflüssigchromatographie, RI: Retentionsindizes, DAD: Diodenarraydetektion, TLC: Dünnschichtchromatographie.

Aus Tab. 17 wird deutlich, dass eine DP > 0,900 nur mit hochauflösenden Detektoren oder aber mit mindestens zweidimensionalen Analysenverfahren erzielt wurde (angesichts der geringen Fallzahl können die Ergebnisse der Zeilen 1 - 3 nicht als Gegenbeweis angeführt werden). Von den zitierten Arbeiten wies [166] die größte untersuchte Substanzzahl (n = 620) auf. Die guten Werte für DP, MLL und XM wurden allerdings durch Einsatz einer arbeitsaufwändigen Kombination vergleichsweise unspezifischer Techniken (TLC-R_F-Werte + GC-Retentionszeiten + UV-Maxima) erreicht, welche die Alltagsroutine eines toxikologisch-chemischen Labors überfordern würde. In der Arbeit von Maier und Bogusz ([100], 372 Substanzen) zeigte sich bereits, dass eine Kombination von HPLC-DAD und standardisierten Retentionszeiten ebenfalls gute Ergebnisse liefert.

Demme et al. [142] untersuchten mittels GC - Ion Trap - MS 244 Medikamentwirkstoffe und erzielten sehr gute Resultate. Die ermittelte DP von 0,9997 soll im folgenden Abschnitt als bewusst hoch gelegte Messlatte für den Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit berechneten Ergebnissen dienen.

Sämtliche anderen Arbeiten leiden unter der geringen Anzahl untersuchter Substanzen. Deren

Auswahl, auch vor dem Hintergrund toxikologischer Relevanz, musste zwangsläufig willkürlich erfolgen. Hinzu kommt, dass in keinem Fall die Verteilung der Listenlängen näher untersucht wurde. Trotzdem müssen sich neu vorgestellte Ergebnisse an den erzielten Resultaten messen lassen.

4.5.9 Ergebnisse dieser Arbeit

Im folgenden werden die Ergebnisse der Berechnungen von RIP, DP, MLL und XM für den Einsatz der HPLC-DAD mit der UV-Spektrenbibliothek vorgestellt. Die Wiedergabe erfolgt zugunsten größerer Übersichtlichkeit getrennt nach den untersuchten Substanzkollektiven, beginnend mit der gesamten Bibliothek. Die jeweils einbezogenen Substanzzahlen wurden bereits in Tab. 15, S. 88, angegeben.

Alle Rechnungen wurden jeweils für drei Schwellenwerte bei der Identifikation über das UV-Spektrum bzw. die spektrale Feinstruktur und für zwei verschieden große RRT-Fenster (± 1 s bzw. ± 2 s) bei der Identifikation über die RRT durchgeführt. Für die kombinierte Identifikation über RRT und Spektrum ergaben sich somit jeweils sechs Werte für jeden Parameter. Die als gültig für die Praxis angesehenen Werte (RRT-Fenster ± 2 s und Schwellenwert $SI > 0,9990$) wurden in den nachfolgenden Tabellen grau unterlegt, die Diskussion beschränkt sich weitgehend auf diese Ergebnisse.

Die Berechnungen wurden direkt anhand der ausgezählten Werte für u (Gesamtzahl aller positiven Identifikationen in der jeweiligen Identifikationsmatrix) durchgeführt. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden die Resultate gerundet.

Tab. 18: Ergebnisse für die gesamte Spektrenbibliothek. Der Substanzvergleich erfolgte auf der Grundlage des UV-Spektrums von 200-380 nm. n = Anzahl der untersuchten Substanzen, s_{LL} = experimentell ermittelte Standardabweichung der Listenlängen bezogen auf MLL.

Identifiziert über	Schwellenwert SI	RIP / %	DP	MLL (Min / Max / s_{LL})	XM
Spektrum (n = 2.682)	$\geq 0,990$	17,86	0,9902	27,20 (1 / 217 / 45,14)	0,038
	$\geq 0,995$	31,92	0,9961	11,39 (1 / 122 / 19,97)	0,096
	$> 0,9990$	60,37	0,9994	2,70 (1 / 28 / 3,79)	0,588

Tab. 18 gibt die Ergebnisse für die Identifizierung nur über das UV-Spektrum für die gesamte Bibliothek wieder. An der DP von 0,9994 zeigt sich bereits die hohe Identifizierungsstärke der UV-Spektren. Diese spiegelt sich auch in den schlechteren MLL-Werten bei niedrigerem Schwellenwert wider: selbst bei $SI \geq 0,990$, bei dem i. d. R. im Spektrum deutliche Unterschiede zu sehen sind, werden im Mittel nur 26 andere (von jeweils 2.681) Verbindungen als identisch gewertet. Beim Schwellenwert $SI > 0,9990$ wird jede Substanz im Mittel mit nur 1,7 anderen verwechselt (MLL = 2,70). Eine DP von 0,9997 wie bei Demme et al. ([142], vgl. voriger Abschnitt) entspräche für n = 2.682 einer MLL von 1,80, hier würde also jede Substanz im Mittel mit 0,8 anderen verwechselt. Der Unterschied ist angesichts der großen Substanzzahl äußerst gering. Eine Übersicht über die Verteilung der Listenlängen gibt Abb. 32.

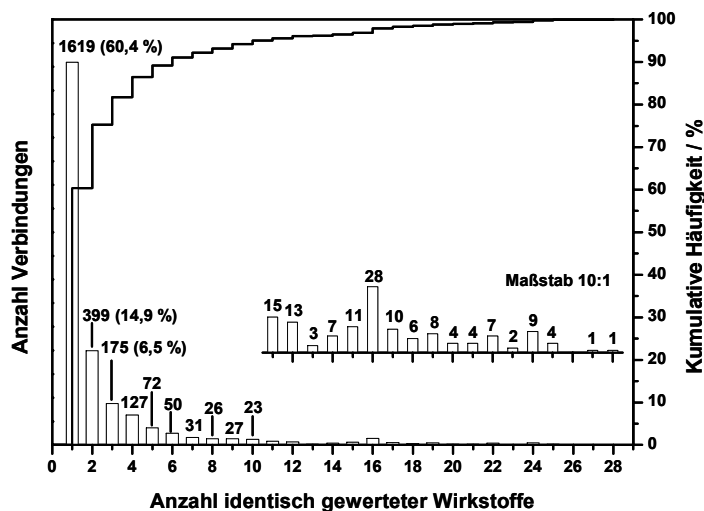


Abb. 32: Verteilung der Anzahl identisch gewerteter Substanzen ("Listenlänge") für die gesamte Spektrenbibliothek (Vergleichsgrundlage: UV-Spektrum, Schwellenwert: SI > 0,9990). Darin ist, wie bei der MLL, die jeweilige Substanz mit einbezogen. "Zwei identisch gewertete Wirkstoffe" bedeutet also: nur eine andere Verbindung wird als identisch gewertet. Der Einschub zeigt die kleineren Werte im Maßstab 1:10. Die Kurve gibt die kumulative Häufigkeit wieder.

60,4 % der Verbindungen werden schon über ihr Spektrum eindeutig identifiziert, 75,3 % sind mit höchstens einer anderen Verbindung verwechselbar. Das Maximum liegt bei 27 verwechselbaren Substanzen, die Standardabweichung s_{LL} beträgt 3,79 (Tab. 18).

Da die Spektrenbibliothek in zwei verschiedenen mobilen Phasen gemessen wurde, wurden diejenigen Berechnungen, bei denen die Substanzidentifizierung ganz oder teilweise über die RRT erfolgte, auch getrennt nach Eluenten durchgeführt. Tab. 19 zeigt zunächst die Ergebnisse für Eluent A.

Tab. 19: Ergebnisse der Berechnung von Selektivitätsparametern für die in Eluent A gemessenen Verbindungen der Spektrenbibliothek. Der Substanzvergleich erfolgte auf der Grundlage des UV-Spektrums, der RRT und der Kombination von beiden.

Identifiziert über	Schwellenwert SI	RIP / %		DP		MLL (Min / Max / s_{LL})		XM	
		± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s
RRT (n = 1.993)	-	0,00	0,00	0,9692	0,9374	62,30 (3 / 112 / 17,71)	125,73 (4 / 197 / 32,32)	0,016	0,008
Spektrum (n = 1.993)	≥ 0,990	19,17		0,9893		22,23 (1 / 180 / 39,30)		0,047	
	≥ 0,995	34,37		0,9955		9,89 (1 / 105 / 18,06)		0,112	
	> 0,9990	60,61		0,9992		2,66 (1 / 25 / 3,62)		0,602	
Spektrum + RRT (n = 1.993)	≥ 0,990	67,29	56,20	0,9996	0,9991	1,85 (1 / 11 / 1,66)	2,70 (1 / 20 / 3,18)	1,180	0,586
	≥ 0,995	77,62	68,44	0,9998	0,9996	1,43 (1 / 9 / 1,01)	1,86 (1 / 15 / 1,87)	2,344	1,157
	> 0,9990	90,02	84,19	0,9999	0,9999	1,13 (1 / 5 / 0,43)	1,25 (1 / 6 / 0,71)	7,846	3,954

Aufgrund der hohen Substanzzahl (knapp 2.000 Substanzen, die sich auf eine totzeitkorrigierte Messzeit von gut 28 min verteilen, im statistischen Mittel also über 70 Substanzen pro Minute) überrascht es nicht, dass keine einzige Substanz nur aufgrund ihrer RRT eindeutig hätte

identifiziert werden können. Bei einer mittleren Listenlänge von fast 126 wird allerdings immer noch eine DP von 0,9374 erreicht. Vergleicht man dies mit den in Tab. 17 angegebenen Literaturwerten, so wurden dort in fast zwei Drittel (35 von 56 Untersuchungen = 62,5 %) der Fälle niedrigere DP-Werte gefunden. Es wären in diesen Arbeiten also z. T. noch wesentlich größere MLL-Werte gefunden worden, hätte man dort die gleiche Anzahl von Substanzen untersucht.

Der große Wert von 32,32 für die Standardabweichung der MLL erklärt sich unter anderem aus der in Abb. 33 dargestellten Abhängigkeit der einzelnen LL-Werte von der RRT.

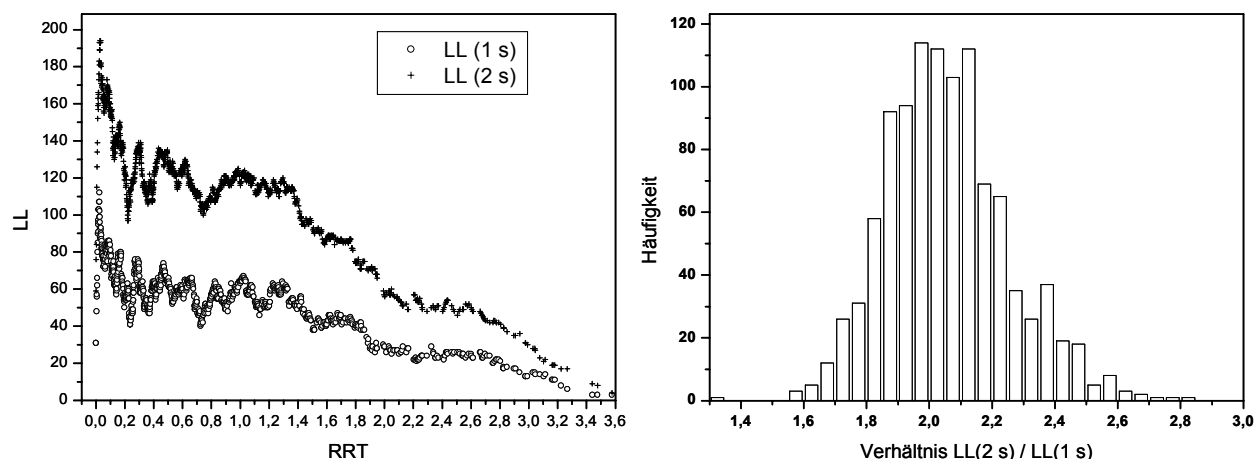


Abb. 33: Links: Auftragung der "List Length" (LL), berechnet allein auf der Basis der RRT (El. A, $n = 1.993$), gegen die RRT bei der Verwendung zweier unterschiedlich großer RRT-Fenster (1 s bzw. 2 s). Rechts: Streuung des Verhältnisses der Listenlängen zwischen 2s- und 1s-Fenster. Die Daten sind normalverteilt (Mittelwert: 2,06, Standardabweichung: 0,20).

Es ist gut zu erkennen, dass die Anzahl in Frage kommender Identifikationskandidaten mit zunehmender RRT deutlich abnimmt. Dies deckt sich mit den für den unteren RRT-Bereich gefundenen Ergebnissen der Abschnitte 4.4.3 (größerer Fehler für $RRT_{i,s}$) und 4.5.1 (Häufung der Substanzen). Gleichzeitig zeigt sich, dass demgegenüber innerhalb enger lokaler RRT-Grenzen von einer Gleichverteilung ausgegangen werden kann: vergleicht man die Listenlängen für das 2s-RRT-Fenster mit denen des genau halb so großen 1s-RRT-Fensters über den gesamten RRT-Bereich, so zeigt sich eine Normalverteilung um den Wert 2,06 mit einer Standardabweichung von 0,2 ($VK = 9,7\%$). Es scheint, dass die untersuchte Anzahl von fast 2.000 Substanzen tatsächlich zu einer repräsentativen Einschätzung der Methode führt.

Die Werte für Eluent A unter ausschließlicher Betrachtung des Spektrums entsprechen in etwa denen für die gesamte Bibliothek. Dies stellt einen weiteren Hinweis auf das erreichte Maß an Repräsentativität der Ergebnisse dar.

Werden UV-Spektrum und RRT für die Identifizierung zusammengefasst, können 84,2 % der Substanzen eindeutig identifiziert werden. Es wird nun eine DP von 0,9999 erreicht (0,999875). Bei einer MLL von 1,25 wird jede Verbindung im Durchschnitt mit nur 0,25 anderen Substanzen verwechselt. Anders ausgedrückt wird im Mittel nur jede vierte Verbindung außer mit sich selbst noch als identisch mit einer anderen Verbindung gewertet. Die zugehörige Verteilung ist in Abb. 34 dargestellt.

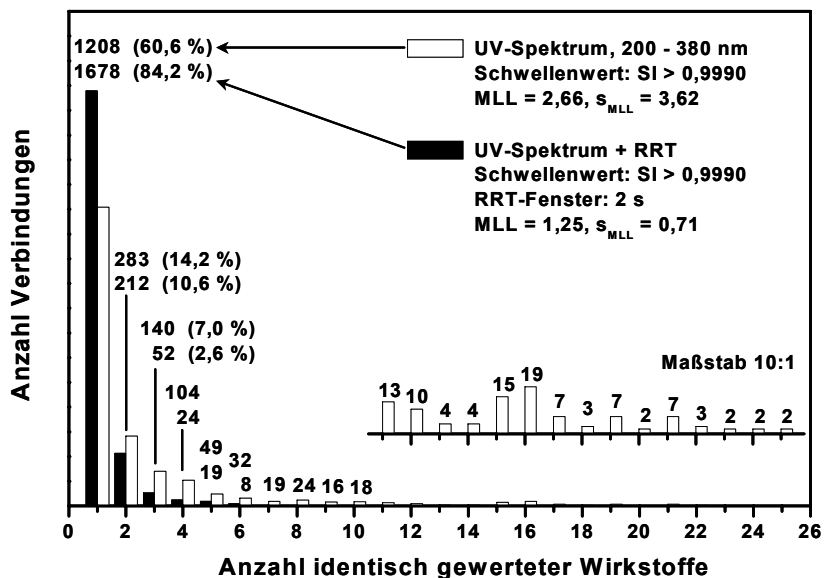


Abb. 34: Verteilung der Anzahl identisch gewerteter Substanzen ("Listenlänge") für die in Eluent A gemessenen Verbindungen aus der Spektrenbibliothek ($n = 1.993$, Vergleichsgrundlage: UV-Spektrum, Schwellenwert: SI > 0,9990 und RRT, Fenster: 2 s). Der Einschub zeigt die kleineren Werte vergrößert im Maßstab 10:1.

Weitere 10,6 % der Verbindungen wurden außer mit sich selbst mit nur einer anderen Verbindung als nicht unterscheidbar gewertet. Insgesamt gibt es also für knapp 95 % der Substanzen nur jeweils maximal einen Kandidaten, mit dem sie verwechselt werden könnten. Das Maximum lag bei sechs identisch gewerteten Substanzen (einschließlich der jeweiligen Substanz selbst). Ein Beispiel für diesen Fall zeigt Abb. 35.

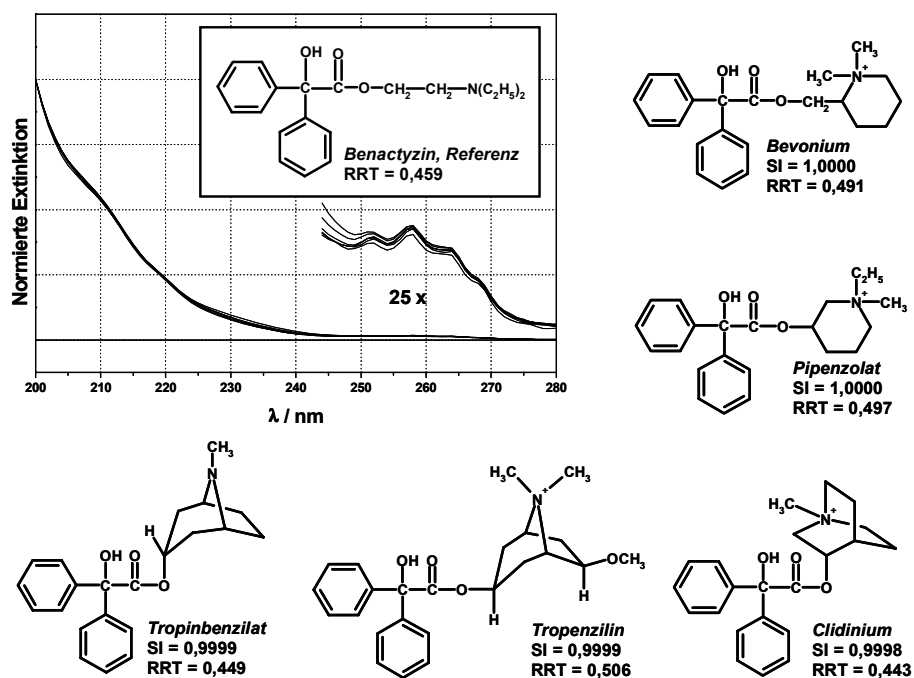


Abb. 35: Beispiel für eine Substanz (Benactyzin), die auch bei der kombinierten Identifizierung mittels UV-Spektrum und RRT noch eine Listenlänge von sechs aufwies. Die fünf Wirkstoffe, die nicht vom Benactyzin unterschieden werden konnten, sind mit ihren SI- und RRT-Werten angegeben. Zusätzlich wurden die betreffenden UV-Spektren übereinandergelegt, die spektrale Feinstruktur wurde um den Faktor 25 vergrößert dargestellt.

Hierzu ist anzumerken, dass zwei weitere der abgebildeten Substanzen (Bevonium und Pipenzolat) zur Gruppe der Stoffe mit einer LL von 6 gehören. In der Abbildung ist zu erkennen, dass alle Verbindungen extrem ähnliche Molekülstrukturen aufweisen, die sich erst in einiger Entfernung vom Chromophor überhaupt unterscheiden. Erschiene eine solche "Problemsubstanz" in einer STA-Messung, könnte jedoch wahrscheinlich durch Messung auf einer anderen Trennsäule (z. B. mit Kationenaustauscheranteil, vgl. Abschnitt 4.5.2) eine Auftrennung herbeigeführt werden. Für die etwa 16 % der Verbindungen, die nicht eindeutig identifizierbar waren, sollte in der Regel die Identifizierung über eine Zweitmethode, beispielsweise TLC oder GC-MS, gelingen.

Die Resultate für Eluent B sind in Tab. 20 aufgeführt. Die RIP für die Kombination Spektrum + RRT liegt noch einmal ca. 5 % höher: rund 92 % der Substanzen werden eindeutig identifiziert. Eine einzige Substanz (0,15 %) konnte schon aufgrund der RRT eindeutig identifiziert werden. Dies ist auf jeden Fall der gegenüber Eluent A geringeren Substanzzahl zuzuschreiben.

Tab. 20: Ergebnisse der Berechnung von Selektivitätsparametern für die in Eluent B gemessenen Verbindungen der Spektrenbibliothek.

Identifikation über	Schwellenwert SI	RIP / %		DP		MLL (Min / Max / s _{LL})		XM	
		± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s
RRT (n = 677)	-	0,30	0,15	0,9330	0,8623	46,321 (1 / 91 / 23,458)	94,11 (1 / 164 / 45,73)	0,021	0,009
Spektrum (n = 689)	≥ 0,990	26,85		0,9880		9,27 (1 / 46 / 1,09)		0,119	
	≥ 0,995	43,98		0,9945		4,76 (1 / 32 / 6,51)		0,265	
	> 0,9990	71,70		0,9986		1,97 (1 / 20 / 2,76)		1,033	
Spektrum + RRT (n = 677)	≥ 0,990	72,67	59,08	0,9994	0,9986	1,44 (1 / 6 / 0,84)	1,95 (1 / 11 / 1,57)	2,286	1,047
	≥ 0,995	83,16	73,86	0,9997	0,9993	1,21 (1 / 6 / 0,54)	1,46 (1 / 10 / 1,07)	4,700	2,182
	> 0,9990	95,72	92,47	0,9999	0,9998	1,05 (1 / 4 / 0,27)	1,12 (1 / 7 / 0,51)	18,804	8,461

Die DP ist geringfügig schlechter als im Eluenten A (um 5×10^{-5}). Ebenfalls aufgrund der geringeren Substanzzahl liegt die MLL deutlich besser (im Mittel werden 0,1 andere Substanzen verwechselt, bzw. nur jede zehnte Substanz wird fälschlicherweise mit einer anderen identisch gewertet). XM liegt aufgrund der geringeren Substanzzahl ebenfalls höher, da ja auch dieser Parameter Kriterium 2 (s. Abschnitt 4.5.7) nicht erfüllte.

Wird der Kreis der Substanzen auf eine Untergruppe strukturell ähnlicher Substanzen eingegrenzt, so ist zu erwarten, dass aufgrund der größeren Ähnlichkeit untereinander schlechtere Werte für DP, MLL und XM resultieren sollten. Zunächst sollen die Ergebnisse für die Gruppe der Substanzen mit (ein- oder mehrfach)substituiertem Phenylchromophor gezeigt werden. Der Vergleich erfolgte zuerst wieder für alle Substanzen der genannten Gruppe auf der Basis des kompletten UV-Spektrums. Zusätzlich wurde zum Vergleich der Wellenlängenbereich auf 230 - 290 nm beschränkt, in dem die charakteristische Schwingungsfeinstruktur der längstwelligsten Phenylbande zu finden ist (vgl. Abb. 36, S. 109).

Tab. 21: Ergebnisse der Berechnung von Selektivitätsparametern für die Substanzen mit substituiertem Phenylchromophor. Der Substanzvergleich erfolgte auf der Grundlage des UV-Spektrums bzw. über die spektrale Feinstruktur (Bereich von 230 - 290 nm).

Identifizierung über	Schwellenwert SI	RIP / %	DP	MLL (Min / Max / s _{LL})	XM
Spektrum (n = 382)	≥ 0,990	7,07	0,9374	24,87 (1 / 74 / 20,76)	0,039
	≥ 0,995	14,92	0,9662	13,89 (1 / 44 / 13,94)	0,075
	> 0,9990	42,41	0,9912	4,37 (1 / 24 / 5,57)	0,294
Feinstruktur (n = 382)	≥ 0,990	7,59	0,9697	12,55 (1 / 42 / 11,60)	0,084
	≥ 0,995	19,37	0,9829	7,50 (1 / 30 / 8,51)	0,151
	> 0,9990	56,02	0,9960	2,53 (1 / 17 / 2,89)	0,649

Wie Tab. 21 zu entnehmen ist, führt dies zu einer Verbesserung der RIP um knapp 14 % und zu einer Senkung der MLL um ca. 1,8. Die Ergebnisse unter Hinzunahme der RRT sind im folgenden wieder nach Eluenten getrennt aufgeführt (Tab. 22 und Tab. 23).

Tab. 22: Ergebnisse der Berechnung von Selektivitätsparametern für die in Eluent A gemessenen Substanzen mit substituiertem Phenylchromophor.

Identifiziert über	Schwellenwert SI	RIP / %		DP		MLL (Min / Max / s _{LL})		XM	
		± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s
RRT (n = 316)	-	1,27	0,32	0,9650	0,9301	12,03 (1 / 29 / 6,06)	23,01 (1 / 42 / 10,18)	0,088	0,042
Spektrum (n = 316)	≥ 0,990	7,59		0,9303		22,96 (1 / 67 / 18,69)		0,042	
	≥ 0,995	15,82		0,9610		13,28 (1 / 41 / 13,03)		0,078	
	> 0,9990	40,82		0,9892		4,42 (1 / 22 / 5,31)		0,289	
Feinstruktur (n = 316)	≥ 0,990	8,54		0,9661		11,67 (1 / 36 / 11,02)		0,091	
	≥ 0,995	19,30		0,9788		7,67 (1 / 30 / 8,65)		0,147	
	> 0,9990	56,01		0,9948		2,63 (1 / 16 / 2,88)		0,609	
Spektrum + RRT (n = 316)	≥ 0,990	51,27	36,39	0,9972	0,9940	1,89 (1 / 8 / 1,25)	2,88 (1 / 10 / 2,14)	1,117	0,529
	≥ 0,995	66,46	50,32	0,9983	0,9962	1,54 (1 / 6 / 0,97)	2,20 (1 / 9 / 1,68)	1,834	0,828
	> 0,999	81,65	74,37	0,9992	0,9985	1,24 (1 / 5 / 0,59)	1,48 (1 / 6 / 1,00)	4,155	2,076
Feinstruktur + RRT (n = 316)	≥ 0,990	64,56	47,47	0,9980	0,9960	1,63 (1 / 6 / 1,06)	2,25 (1 / 9 / 1,74)	1,593	0,795
	≥ 0,995	74,37	61,08	0,9987	0,9973	1,41 (1 / 5 / 0,85)	1,85 (1 / 8 / 1,49)	2,428	1,167
	> 0,9990	87,97	82,28	0,9995	0,9990	1,17 (1 / 4 / 0,49)	1,32 (1 / 5 / 0,78)	6,074	3,157

Durch die Hinzunahme der RRT wird die RIP wieder stark erhöht, rund 82 % der Substanzen werden eindeutig identifiziert. Die DP liegt immerhin bei 0,9990 bei einer MLL von 1,32, es werden also im Mittel nur rund 0,3 Verbindungen fälschlich als identisch gewertet. Diese wiederum sehr guten Werte wurden allerdings durch die geringere Substanzzahl begünstigt. Tab. 23 zeigt die Ergebnisse für Eluent B. Angesichts einer RIP von knapp 94 % und einer MLL von 1,06 kann hier bereits von einer fast eindeutigen Identifizierung innerhalb des allerdings recht kleinen Substanzkreises gesprochen werden.

Tab. 23: Ergebnisse der Berechnung von Selektivitätsparametern für die in Eluent B gemessenen Substanzen mit substituiertem Phenylchromophor.

Identifiziert über	Schwellenwert SI	RIP / %		DP		MLL (Min / Max / s _{LL})		XM	
		± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s
RRT (n = 65)	-	6,15	3,08	0,9063	0,8010	7,00 (1 / 16 / 3,97)	13,74 (1 / 26 / 7,82)	0,151	0,063
Spektrum (n = 66)	≥ 0,990	21,21		0,9450		4,58 (1 / 13 / 3,63)		0,264	
	≥ 0,995	37,88		0,9758		2,58 (1 / 9 / 2,09)		0,619	
	> 0,9990	77,27		0,9958		1,27 (1 / 3 / 0,54)		3,651	
Feinstruktur (n = 66)	≥ 0,990	34,85		0,9786		2,39 (1 / 7 / 1,64)		0,702	
	≥ 0,995	62,12		0,9921		1,52 (1 / 4 / 0,77)		1,926	
	> 0,9990	81,82		0,9972		1,18 (1 / 2 / 0,39)		5,485	
Spektrum + RRT (n = 65)	≥ 0,990	72,31	63,08	0,9913	0,9885	1,55 (1 / 5 / 1,09)	1,74 (1 / 6 / 1,29)	1,790	1,339
	≥ 0,995	78,46	80,00	0,9957	0,9962	1,28 (1 / 4 / 0,60)	1,25 (1 / 4 / 0,56)	3,595	4,047
	> 0,9990	93,85	96,92	0,9990	0,9995	1,06 (1 / 2 / 0,24)	1,03 (1 / 2 / 0,17)	16,234	32,484
Feinstruktur + RRT (n = 65)	≥ 0,990	92,31	86,15	0,9986	0,9966	1,09 (1 / 3 / 0,34)	1,22 (1 / 4 / 0,60)	10,818	4,627
	≥ 0,995	93,85	87,69	0,9990	0,9981	1,06 (1 / 2 / 0,24)	1,12 (1 / 2 / 0,33)	16,234	8,109
	> 0,9990	96,92	93,85	0,9995	0,9990	1,03 (1 / 2 / 0,17)	1,06 (1 / 2 / 0,24)	32,484	16,234

Im folgenden werden die Ergebnisse für die Gruppe der Substanzen mit lediglich einfachsubstituiertem Phenylchromophor gezeigt.

Tab. 24: Ergebnisse der Berechnung von Selektivitätsparametern für die Substanzen mit einfachsubstituiertem Phenylchromophor.

Identifiziert über	Schwellenwert SI	RIP / %	DP	MLL (Min / Max / s _{LL})	XM
Spektrum (n = 139)	≥ 0,990	5,04	0,7178	39,95 (1 / 72 / 19,49)	0,018
	≥ 0,995	9,35	0,8242	25,26 (1 / 43 / 14,93)	0,034
	> 0,9990	20,86	0,9473	8,27 (1 / 22 / 7,00)	0,130
Feinstruktur (n = 139)	≥ 0,990	9,35	0,8564	20,81 (1 / 41 / 13,47)	0,043
	≥ 0,995	17,27	0,9067	13,88 (1 / 30 / 10,91)	0,070
	> 0,9990	49,64	0,9787	3,94 (1 / 17 / 4,23)	0,333

Erwartungsgemäß liegen aufgrund der extrem geringen strukturellen Unterschiede in Chromophornähe die Ergebnisse noch schlechter als in der vorigen Gruppe. Zu beobachten ist, dass die relative Steigerung der RIP bei Beschränkung auf den Bereich der Feinstruktur noch einmal größer ist. Immerhin noch 50 % der untersuchten Substanzen waren nur aufgrund ihres Spektrums eindeutig identifizierbar. Nach Hinzunahme der RRT werden in Eluent A trotz der großen Substanzähnlichkeit immer noch Werte für DP und MLL im Bereich der Literaturwerte gefunden (Tab. 25, vgl. die Zeilen 25 - 36 und 38 - 56 mit n = 99 bzw. n = 100 in Tab. 17, S. 96).

Vor dem Hintergrund der äußerst niedrigen Substanzzahlen werden die Ergebnisse für Eluent B hier nur der Vollständigkeit halber mit angegeben (Tab. 26).

Tab. 25: Ergebnisse der Berechnung von Selektivitätsparametern für die in Eluent A gemessenen Substanzen mit einfachsubstituiertem Phenylchromophor.

Identifiziert über	Schwellenwert SI	RIP / %		DP		MLL (Min / Max / s _{LL})		XM	
		± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s
RRT (n = 125)	-	3,20	0,00	0,9661	0,9303	5,21 (1 / 12 / 2,50)	9,64 (2 / 17 / 4,10)	0,230	0,108
	≥ 0,990	5,60		0,7106		36,89 (1 / 65 / 17,48)		0,020	
Spektrum (n = 125)	≥ 0,995	9,60		0,8164		23,77 (1 / 40 / 13,57)		0,036	
	> 0,9990	21,60		0,9443		7,91 (1 / 22 / 6,47)		0,137	
	≥ 0,990	12,80		0,8490		19,72 (1 / 36 / 13,01)		0,045	
Feinstruktur (n = 125)	≥ 0,995	19,20		0,8965		13,83 (1 / 30 / 10,79)		0,070	
	> 0,9990	48,00		0,9761		3,96 (1 / 16 / 4,02)		0,330	
	≥ 0,990	39,20	17,60	0,9905	0,9774	2,18 (1 / 7 / 1,37)	3,80 (1 / 9 / 2,23)	0,837	0,349
Spektrum + RRT (n = 125)	≥ 0,995	54,40	33,60	0,9937	0,9849	1,78 (1 / 6 / 1,12)	2,87 (1 / 8 / 1,97)	1,267	0,526
	> 0,9990	77,60	68,00	0,9974	0,9942	1,32 (1 / 5 / 0,71)	1,72 (1 / 6 / 1,27)	3,117	1,381
	≥ 0,990	58,40	40,00	0,9937	0,9863	1,78 (1 / 6 / 1,21)	2,70 (1 / 9 / 2,11)	1,267	0,582
Feinstruktur + RRT (n = 125)	≥ 0,995	66,40	52,00	0,9957	0,9907	1,53 (1 / 5 / 0,90)	2,15 (1 / 8 / 1,77)	1,886	0,860
	> 0,9990	88,80	80,80	0,9988	0,9972	1,14 (1 / 4 / 0,45)	1,35 (1 / 5 / 0,85)	6,936	2,833

Tab. 26: Ergebnisse der Berechnung von Selektivitätsparametern für die in Eluent B gemessenen Substanzen mit einfachsubstituiertem Phenylchromophor.

Identifiziert über	Schwellenwert SI	RIP / %		DP		MLL (Min / Max / s _{LL})		XM	
		± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s	± 1 s	± 2 s
RRT (n = 14)	-	50,00	28,57	0,9451	0,8132	1,714 (1 / 3 / 0,83)	3,43 (1 / 6 / 1,87)	1,323	0,335
Spektrum (n = 14)	≥ 0,990	28,57		0,7692		4,00 (1 / 9 / 2,54)		0,256	
	≥ 0,995	28,57		0,9121		2,14 (1 / 4 / 0,95)		0,798	
	> 0,9990	64,29		0,9560		1,57 (1 / 3 / 0,85)		1,673	
Feinstruktur (n = 14)	≥ 0,990	21,43		0,9011		2,29 (1 / 4 / 0,91)		0,701	
	≥ 0,995	57,14		0,9670		1,43 (1 / 2 / 0,51)		2,256	
	> 0,9990	100,00		1,0000		1,00 (1 / 1 / 0,00)		∞	
Spektrum + RRT (n = 14)	≥ 0,990	71,43	64,29	0,9780	0,9341	1,29 (1 / 2 / 0,47)	1,86 (1 / 5 / 1,29)	3,423	1,090
	≥ 0,995	71,43	64,29	0,9780	0,9560	1,29 (1 / 2 / 0,47)	1,57 (1 / 3 / 0,85)	3,423	1,673
	> 0,9990	85,71	78,57	0,9890	0,9670	1,14 (1 / 2 / 0,36)	1,43 (1 / 3 / 0,85)	6,923	2,256
Feinstruktur + RRT (n = 14)	≥ 0,990	100,00	85,71	1,0000	0,9890	1,00 (1 / 1 / 0,00)	1,14 (1 / 2 / 0,36)	∞	6,923
	≥ 0,995	100,00	85,71	1,0000	0,9890	1,00 (1 / 1 / 0,00)	1,14 (1 / 2 / 0,36)	∞	6,923
	> 0,9990	100,00	100,00	1,0000	1,0000	1,00 (1 / 1 / 0,00)	1,00 (1 / 1 / 0,00)	∞	∞

Eine zu 100 % eindeutige Identifizierung ist zwar ein wirklich zufriedenstellendes Ergebnis, angesichts von n = 14 aber nicht als besonders aussagekräftig zu bezeichnen. Das Resultat belegt aber erneut den Umstand, dass eine gewisse Mindestgröße von n für eine vernünftige Methodenbewertung unerlässlich ist. Aus den in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnissen scheint hierfür eine Zahl von ungefähr n = 2.000 ausreichend zu sein.

Tab. 27: Zusammenstellung der für die Anwendung der Spektrenbibliothek maßgeblichen Ergebnisse für die Berechnung der Selektivitätsparameter. Zugrundegelegt wurden ein RRT-Fenster von ± 2 s sowie ein SI-Schwellenwert $\geq 0,9990$.

Substanzgruppe	Teilgruppe	Identifiziert über	RIP / %	DP	MLL (Min / Max / s _{LL})	XM	
Gesamte Bibliothek	Alle	Spektrum	60,37	0,9994	2,70 (1 / 28 / 3,79)	0,588	
	Eluent A	RRT	0,00	0,9374	125,73 (4 / 197 / 32,32)	0,008	
		Spektrum	60,61	0,9992	2,66 (1 / 25 / 3,62)	0,602	
		Spektrum + RRT	84,19	0,9999	1,25 (1 / 6 / 0,71)	3,954	
	Eluent B	RRT	0,15	0,8623	94,11 (1 / 164 / 45,73)	0,009	
		Spektrum	71,70	0,9986	1,97 (1 / 20 / 2,76)	1,033	
		Spektrum + RRT	92,47	0,9998	1,12 (1 / 7 / 0,51)	8,461	
Substituierte Phenyle	Alle	Spektrum	42,41	0,9912	4,37 (1 / 24 / 5,57)	0,294	
		Feinstruktur	56,02	0,9960	2,53 (1 / 17 / 2,89)	0,649	
	Eluent A	RRT	0,32	0,9301	23,01 (1 / 42 / 10,18)	0,042	
		Spektrum	40,82	0,9892	4,42 (1 / 22 / 5,31)	0,289	
		Feinstruktur	56,01	0,9948	2,63 (1 / 16 / 2,88)	0,609	
		Spektrum + RRT	74,37	0,9985	1,48 (1 / 6 / 1,00)	2,076	
		Feinstruktur + RRT	82,28	0,9990	1,32 (1 / 5 / 0,78)	3,157	
	Eluent B	RRT	3,08	0,8010	13,74 (1 / 26 / 7,82)	0,063	
		Spektrum	77,27	0,9958	1,27 (1 / 3 / 0,54)	3,651	
		Feinstruktur	81,82	0,9972	1,18 (1 / 2 / 0,39)	5,485	
		Spektrum + RRT	96,92	0,9995	1,03 (1 / 2 / 0,17)	32,484	
		Feinstruktur + RRT	93,85	0,9990	1,06 (1 / 2 / 0,24)	16,234	
	Einfachsubstituierte Phenyle	Alle	Spektrum	20,86	0,9473	8,27 (1 / 22 / 7,00)	0,130
			Feinstruktur	49,64	0,9787	3,94 (1 / 17 / 4,23)	0,333
		Eluent A	RRT	0,00	0,9303	9,64 (2 / 17 / 4,09)	0,108
Spektrum			21,60	0,9443	7,91 (1 / 22 / 6,47)	0,137	
Feinstruktur			48,00	0,9761	3,96 (1 / 16 / 4,02)	0,330	
Spektrum + RRT			68,00	0,9942	1,72 (1 / 6 / 1,27)	1,381	
Feinstruktur + RRT			80,80	0,9972	1,35 (1 / 5 / 0,85)	2,833	
Eluent B		RRT	28,57	0,8132	3,43 (1 / 6 / 1,87)	0,335	
		Spektrum	64,29	0,9560	1,57 (1 / 3 / 0,85)	1,673	
		Feinstruktur	100,00	1,0000	1,00 (1 / 1 / 0,00)	∞	
		Spektrum + RRT	78,57	0,9670	1,43 (1 / 3 / 0,85)	2,256	
		Feinstruktur + RRT	100,00	1,0000	1,00 (1 / 1 / 0,00)	∞	

In Tab. 27 sind noch einmal die für die Anwendung der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten HPLC-DAD-Methode relevanten Ergebnisse (2s-RRT-Fenster und SI-Schwellenwert 0,9990) zusammengefasst.

Die Werte für den in der vorliegenden Arbeit aus der Kaiserschen Selektivitätsformel abgeleiteten mittleren Selektivität XM wurden hier nur aufgeführt, aber nicht im einzelnen diskutiert. Dies bleibt einem Vergleich mit Ergebnissen künftiger Arbeiten mit vergleichbaren Substanzzahlen vorbehalten.

An dieser Stelle sollen aber einige allgemeine Anmerkungen zu XM gemacht werden: Obwohl dieser Parameter – anders als die anderen behandelten Kenngrößen – direkt aus einer wissenschaftlich formulierten Definition der Selektivität abgeleitet wurde, zeigte sich leider in der Diskussion eine starke Abhängigkeit von der Substanzzahl n . Vergleicht man z. B. die XM in Höhe von 3,954, die in dieser Arbeit für Eluent A (Spektrum + RRT, 1.993 Substanzen) gefunden wurde (Tab. 27) mit dem in Zeile 55 / Tab. 17 (S. 96) für ein Verfahren mit der gleichen Discriminating Power (0,9998), aber nur 99 untersuchten Substanzen berechneten Wert von fast 50, wird das Problem sehr deutlich.

Hieraus muss der Schluss gezogen werden, dass auch XM für den Vergleich von Methoden mit deutlich unterschiedlicher untersuchter Substanzzahl grundsätzlich ungeeignet erscheint. Andersherum wurden bisher keine Untersuchungen veröffentlicht, in denen auch nur annähernd ähnliche Substanzzahlen untersucht worden wären, so dass eine Einordnung der hier gefundenen Ergebnisse zunächst nicht möglich ist. Lediglich für die ebenfalls untersuchten, strukturell ähnlicheren Substanzkollektive mit kleineren Substanzzahlen zeigte sich, dass die Resultate i. a. höher lagen als die Literaturwerte in Tab. 17.

Trotz aller genannten Einschränkungen wurde XM dennoch in der Arbeit belassen, da nur dieser Parameter den Bereich kleinerer Selektivitätsunterschiede beim Vergleich hochselektiver Methoden überzeugend auflösen konnte. Angesichts der Tatsache, dass ohnehin kein einziger Selektivitätsparameter alle Aspekte der Diskussion berücksichtigen konnte, kann XM u. U. eine interessante und darüber hinaus auch wissenschaftlich nachvollziehbare Zusatzinformation darstellen.

Zusammenfassend kann jedoch festgestellt werden, dass sich die berechneten Ergebnisse mehr als gut in die vorhandenen Angaben aus der Literatur einordnen. Trotz weitaus höherer Substanzzahlen wurden in der Regel annähernd gleich gute oder sogar bessere Resultate erzielt.

4.5.10 Nicht berücksichtigte Einflussgrößen

In die Berechnung der Ergebnisse des vorigen Abschnittes konnten einige Gesichtspunkte nicht mit einfließen, die sich in der Praxis durchaus auf die Methodenselektivität auswirken:

- Sämtliche für die gesamte Spektrenbibliothek berechneten SI-Werte wurden auf der Grundlage des vollständigen Spektrums ermittelt. In der Anwendungspraxis sollte bei der Ermittlung der spektralen Ähnlichkeit jedoch vorteilhaft nur derjenige Teil des Spektrums berücksichtigt werden, in dem eine nennenswerte Absorption gefunden wird. In kritischen Fällen ist es sinnvoll, den Vergleichsbereich daher nur bis zur langwelligen Absorptionsgrenze festzulegen, um zu verhindern, dass die Nulllinie bis zum Ende des Messbereiches mit in den Suchalgorithmus eingeht. Leider war es angesichts der Zahl

betrachteter Substanzen im Rahmen der vorliegenden Arbeit unmöglich, beim Substanzvergleich diese individuellen Anpassungen zu berücksichtigen. Es liegt auf der Hand, dass sich dann die erzielten Werte noch einmal spürbar verbessert hätten.

- Trotz der unverzichtbaren Unterstützung durch den Computer bei der Bibliothekssuche hat sich das menschliche Auge beim Spektrenvergleich letztlich als überlegen herausgestellt. Daher gilt in der Praxis ein Spektrum nur dann als identifiziert, wenn auch ein visueller Vergleich am Bildschirm das Ergebnis bestätigen konnte. Dieser Schritt ist allerdings mathematisch nicht zu fassen, erneut wird die tatsächliche Leistungsfähigkeit der Methode durch die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Berechnungen eher unterschätzt (eine richtige Identifizierung des Computers würde durch den visuellen Abgleich bestätigt, eine falsche Zuordnung könnte dagegen korrigiert werden).
- Die hier vorgenommenen Untersuchungen können sich nur auf den Fall beziehen, dass die zu identifizierende Substanz in der Bibliothek registriert ist. Zwangsläufig werden auch im praktischen Alltag gelegentlich Signale von Substanzen gefunden, die nicht in der Bibliothek enthalten sind. Gleichwohl stellt natürlich auch das Nichtvorhandensein in der Bibliothek eine wichtige Aussage dar, da somit immerhin beinahe 2.700 relevante Substanzen ausgeschlossen werden können.
- Andersherum kann eine Substanzidentifizierung in Bezug auf alle möglichen toxikologisch relevanten Substanzen niemals mit 100-%-iger Sicherheit festgestellt werden: es könnte ja sein, dass es außerhalb der Bibliothek Stoffe gibt, deren Messwerte zufällig genau mit den gemessenen übereinstimmen. Die Wahrscheinlichkeit kann aber auch angesichts der hier vorgestellten Ergebnisse als eher gering angesehen werden.

4.6 Spezifität

4.6.1 Spektroskopische Variabilität als Voraussetzung für Spezifität

In Abschnitt 2.3.4 wurde bereits erläutert, dass der Begriff "Spezifität" in der vorliegenden Arbeit weniger auf das Messverfahren als auf die betrachteten Messgrößen bezogen wurde. Die (relative) Retentionszeit wurde allerdings von vornherein als vergleichsweise unspezifische Messgröße eingestuft, so dass sich die durchgeführten Untersuchungen ausschließlich auf das UV-Spektrum bezogen.

Betrachtet man - wie in der vorliegenden Arbeit - eine große Anzahl von Substanzen, so sollten diese im Falle großer Spezifität der UV-Spektren ein hohes Maß an spektroskopischer Variabilität aufweisen. Als Beleg hierfür wäre zum einen eine im Mittel breite Verteilung der Extinktion über den betrachteten Messbereich zu werten, da die Variationsmöglichkeiten eines Spektrums mit zunehmend breiterem Absorptionsbereich exponentiell zunehmen.

Abb. 36 zeigt die durchschnittliche Extinktion sowohl aller Substanzen der Spektrenbibliothek, als auch diejenige der Untergruppen aller Verbindungen mit substituiertem bzw. mit einfach-substituiertem Phenylchromophor (vgl. Abb. 28, S. 88) als Mittelwert der auf das Maximum Eins normierten Spektren.

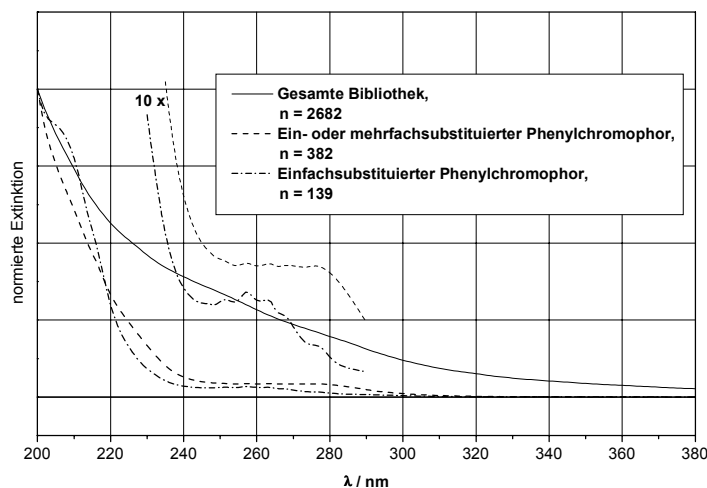


Abb. 36: Gemittelte Spektren verschiedener Substanzgruppen. Sämtliche Spektren der betrachteten Gruppen wurden zunächst auf das Maximum Eins normiert, anschließend wurde die Extinktion für jede Wellenlänge aufsummiert, das Ergebnis wurde jeweils erneut auf das Maximum Eins normiert.

Die Kurve für die gesamte Bibliothek fällt zu längeren Wellenlängen hin deutlich langsamer ab, als zunächst erwartet: bei 209 nm beträgt die Extinktion noch 75 %, bei 226 nm sind es noch 50 %, bei 266 nm 25 % und bei 307 nm immerhin noch 10 % des Maximums. Für den Substanzkreis mit substituiertem Phenylchromophor ist die spektroskopische Variabilität auf den ersten Blick geringer, man kann in der vergrößerten Darstellung des Bereiches zwischen 230 und 290 nm sogar noch Ansätze der Vibrationsfeinstruktur erkennen. Gleichzeitig aber unterscheidet sich das gemittelte Spektrum dieser Gruppe deutlich von demjenigen der gesamten Bibliothek.

Wird nur die Gruppe der Wirkstoffe mit einfachsubstituiertem Phenylchromophor betrachtet, ist im gemittelten Spektrum sogar eine ausgeprägte Feinstruktur zu erkennen. Durch diese Feinstruktur lässt sich die Gruppe als ganzes gut von anderen Wirkstoffgruppen unterscheiden. Wie die Ergebnisse in Abschnitt 4.5.9 zeigen, lassen sich aber immerhin noch mehr als 20 % der Wirkstoffe anhand ihres Spektrums eindeutig identifizieren, die MLL liegt allerdings mit 8,27 schon relativ hoch. Dass sich hinter dem gemittelten Spektrum dieser Gruppe in Wirklichkeit noch erhebliche spektrale Unterschiede verbergen, zeigen auch die Ergebnisse in Abschnitt 4.6.10.

Des weiteren galt die Annahme, dass sich Verbindungen mit unterschiedlichen Chromophoren / Absorptionssystemen auf jeden Fall spektroskopisch voneinander unterscheiden lassen sollten. Die Richtigkeit dieser Aussage wurde nicht nur durch die jahrelange Erfahrung mit der Methode, sondern auch durch die Ergebnisse der Abschnitte 4.6.2 bis 4.6.14 belegt. Dann sollte die Anzahl verschiedener Absorptionssysteme im betrachteten Substanzkollektiv ebenfalls ein Gradmesser für die spektroskopische Variabilität sein.

Wie in Abschnitt 4.1.3 geschildert, wurden sämtliche im Substanzbestand der Spektrenbibliothek vorkommenden Chromophore ihrer chemischen Struktur nach erfasst und gezählt. Tab. 28 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Auszählung. Nach der gewählten Definition (s. Abschnitt 2.1.8) enthielten 2.560 der 2.682 Verbindungen einen oder mehrere (bis zu sechs) von insgesamt 1.486 verschiedenen, bekannten Chromophoren.

Tab. 28: Daten zur Auszählung der Chromophore im Substanzbestand der Spektrenbibliothek.

Kategorie	Anzahl
Insgesamt erfasste Verbindungen	2.888
Ohne UV-Absorption	206
Mit UV-Absorption	2.682
Mit unbekanntem bzw. unklarem Chromophor	12
Ohne (definitionsgemäßen) Chromophor, aber mit UV-Absorption	110
Mit einem oder mehreren definitionsgemäßen Chromophoren	2.560
Mit einem Chromophor	1.996
Mit zwei Chromophoren	474
Mit drei Chromophoren	81
Mit vier Chromophoren	6
Mit fünf Chromophoren	1
Mit sechs Chromophoren	2

110 Spektren stammten von Substanzen mit UV-Absorption, aber ohne definitionsgemäßen Chromophor, bei 12 Substanzen konnte die Strukturformel nicht ermittelt werden. Insgesamt wurden 1.650 unterschiedliche Absorptionssysteme (einzelne Chromophore bzw. Kombinationen mehrerer Chromophore) gefunden (Abb. 37).

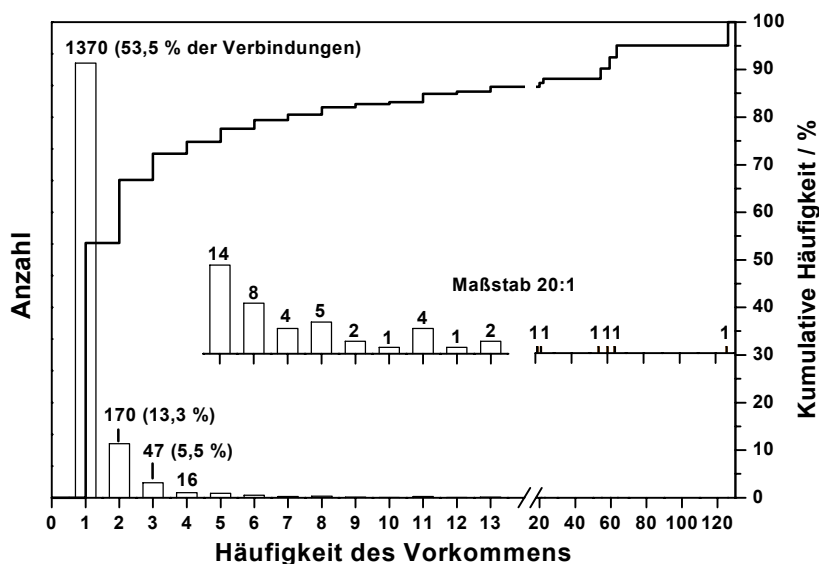


Abb. 37: Anzahl der verschiedenen Absorptionssysteme, geordnet nach Häufigkeit in der Spektrenbibliothek. Die Prozentzahlen und die dargestellte kumulative Häufigkeit beziehen sich auf die Gesamtheit der 2.560 Verbindungen mit bekanntem Absorptionssystem; zu ihrer Ermittlung muss die Anzahl der Absorptionssysteme in der jeweiligen Kategorie mit der Häufigkeit multipliziert werden. So gibt es z. B. 47 Absorptionssysteme, die in der Bibliothek jeweils dreimal vorkommen, dies entspricht $3 \times 47 = 141$ Verbindungen, also 5,5 % von 2.560.

53,5 % der Verbindungen besaßen ein einzigartiges Absorptionssystem, weitere 13,3 % eines, das in der Bibliothek lediglich ein weiteres Mal gefunden wurde. Unter der Annahme, dass Verbindungen mit unterschiedlichen Absorptionssystemen über ihr UV-Spektrum unterschieden

werden können, sollten also mindestens 53,5 % aller Substanzen auf dieser Grundlage eindeutig identifizierbar sein. Dieser Wert liegt etwas niedriger als der über die Auszählung der Identifikationsmatrix gefundene (60,4 %, vgl. Tab. 18, S. 98), demnach wiesen einige der untersuchten Verbindungen selbst bei gleichem Chromophor / Absorptionssystem noch spektrale Unterschiede auf.

Dies ist vor allem der vergleichsweise starren Definition des Chromophorenbegriffs zuzuschreiben, die den z. T. erheblichen Einfluss der Seitenketten auf das Spektrum ignoriert.

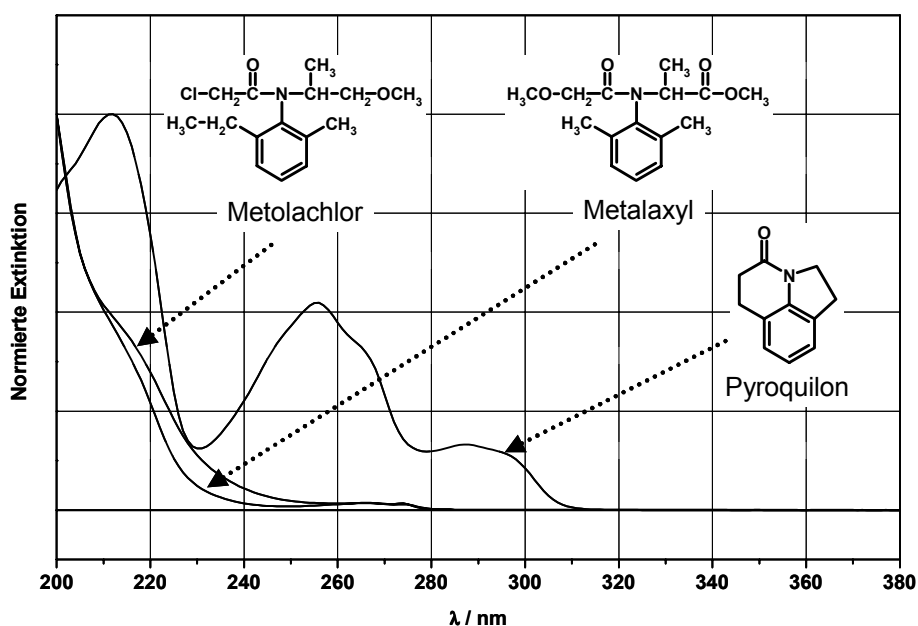


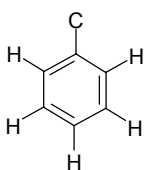
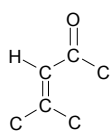
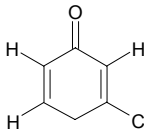
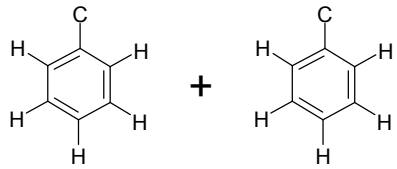
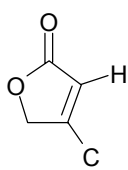
Abb. 38: Einfluss sterischer Hinderung auf die Spektren von Metolachlor, Metalaxyl und Pyroquilon. Alle drei Verbindungen tragen nach der hier verwendeten Systematik nominell den gleichen Chromophor (N-Acetyl-N,2,6-trimethylanilin). Bedingt durch die sterisch anspruchsvollen Seitenketten kann bei den beiden erstgenannten Substanzen keine Koplanarität und somit keine Konjugation zwischen dem aromatischen Ring und den in Wirklichkeit durch Mesomerie delokalisierten π -Elektronen der Imidbindung entstehen. Beim Pyroquilon wird diese Anordnung dagegen durch Ringschluss erzwungen.

Abb. 38 zeigt ein Beispiel für den Einfluss sterischer Hinderung auf das Spektrum dreier Verbindungen mit nominell demselben Chromophor. Auch andere Einwirkungen von nicht direkt am Chromophor angesiedelten Struktureinheiten (Hyperkonjugation, Ringspannung, Wasserstoffbrücken, Charge-Transfer-Wechselwirkungen) wurden beobachtet, einige davon werden in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

Den zahlreichen einzigartigen bzw. nur selten gefundenen Absorptionssystemen stehen auf der anderen Seite einige wenige besonders häufig angetroffene gegenüber. Tab. 29 zeigt die fünf häufigsten Absorptionssysteme.

Die Verbindungen mit Toluolchromophor bildeten auch den größten Teil der Gruppe der Verbindungen mit einfachsubstituiertem Phenylchromophor (vgl. Tab. 24 bis Tab. 26). Alle fünf hier aufgeführten Strukturelemente wurden bei der Auswahl wichtiger Gruppen für die Klassifizierung (s. Abschnitt 4.6.3) berücksichtigt.

Tab. 29: Die fünf häufigsten Absorptionssysteme. Die relative Häufigkeit ist gegeben als das Verhältnis der Anzahl der betreffenden Substanzen zur Gesamtheit aller 2.560 Verbindungen.

Rang	Absorptionssystem	Häufigkeit absolut	Häufigkeit relativ
1	 Toluol	126 x	4,9 %
2	 4-Methylpent-3-en-2-on	64 x	2,5 %
3	 3-Methylcyclohexa-2,5-dienon	60 x	2,3 %
4	 2 x Toluol, isoliert	55 x	2,1 %
5	 3-Methyl-5-oxacyclopent-2-enon	23 x	0,9 %

4.6.2 Konzept für eine hierarchische Klassifizierung

Die methodischen Möglichkeiten der HPLC-DAD für die STA würden erheblich erweitert, wäre es möglich, auch nicht in der Spektrenbibliothek enthaltene Substanzen anhand ihrer Spektren einer Wirkstoffgruppe zuzuordnen (Klassifizierung, s. Abschnitt 2.5.5). Heutzutage für diesen Zweck beispielsweise im Bereich der Massenspektroskopie erhältliche Expertensysteme sind nach Meinung von Poletti [65] noch unausgereift und zu kompliziert für den Routineeinsatz. Der Autor stellt aber fest: "Die Identifizierung unbekannter Substanzen auf der Basis des Zusammenhangs zwischen analytischer Information und strukturellen Eigenschaften gehört zu den zukünftigen Herausforderungen der STA."

Auch wenn nachfolgend ein vergleichsweise umfangreiches Klassifikationssystem vorgestellt wird, lag die Zielrichtung für diese Arbeit weniger in der Schaffung eines funktionsfähigen Expertensystems für die tägliche Praxis. Es ist auch nicht auszuschließen, dass sich Algorithmen finden ließen, die zwischen den untersuchten Gruppen noch besser getrennt hätten. Hier wäre

wohl vor allem des weiter oben beschriebenen SIMCA (vgl. Abschnitt 2.5.6) zu nennen. Diese Methoden werden jedoch in der Regel nur im Rahmen teurer chemometrischer Spezialsoftware (beispielsweise "The Unscrambler" der norwegischen Firma CAMO) zur Verfügung gestellt. Die vorliegende Arbeit zeigt andersherum, welche guten Ergebnisse bereits mit weit verbreiteter Standardstatistiksoftware (SPSS) erzielt werden können.

Das Hauptanliegen lag allerdings ohnehin in der Absicht, den oft unterschätzten hohen Gehalt an strukturspezifischer Information zu belegen, der in den UV-Spektren pharmakologisch und toxikologisch relevanter Verbindungen enthalten ist. Eine gelungene Klassifizierung wäre somit ein weiterer Beleg für die hohe Spezifität der UV-Spektren, die sich hier mit einer gewissen Ambivalenz folgendermaßen formulieren ließe: ähnliche Absorptionssysteme liefern grundsätzlich sehr ähnliche Spektren (Beleg durch richtige Gruppenzuordnung), gleichwohl sind feine strukturelle Unterschiede, auch in größerer Entfernung vom Absorptionssystem, auflösbar.

Auch wenn mit den vorgelegten Ergebnissen sicher noch kein "Expertensystem" geschaffen wurde, wurde doch eine Vielzahl praktischer Alltagserfahrungen und Beobachtungen aus mehrjähriger HPLC-DAD-Erfahrung integriert und übersichtlich zusammengefasst. Allein diese Sicherung ansonsten eher beiläufig gesammelter Erfahrung stellt einen wichtigen Aspekt dar. Das Modell bildet des weiteren eine aussagekräftige Basis, die durch Hinzufügen neuer Gruppen oder Substanzen oder durch Anpassen bestehender Gruppen jederzeit nach Bedarf erweitert und optimiert werden kann.

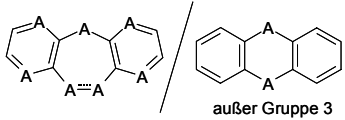
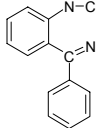
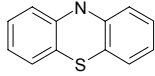
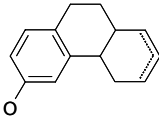
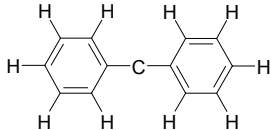
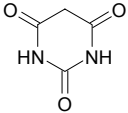
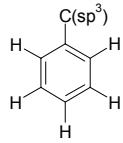
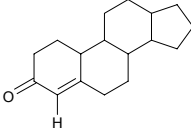
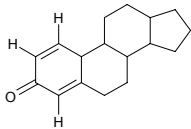
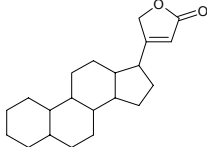
4.6.3 Hauptgruppen

Die wichtigste Voraussetzung für ein geeignetes Klassifikationsmodell bestand zunächst einmal in der Festlegung geeigneter Gruppen. Für die Auswahl der im folgenden als "Hauptgruppen" bezeichneten Klassen auf der obersten Stufe der Klassifizierungshierarchie sollten sowohl die häufigsten Chromophore (s. Tab. 29) als auch die für den Alltag der klinisch- und forensisch-toxikologischen Analyse wichtigsten Substanzklassen angemessen berücksichtigt werden. Ebenfalls sollten Gruppen mit typischem Chromophor und typischer Wirkung Berücksichtigung finden (z. B. Barbiturate). Es wurden nur Substanzen mit ausschließlich einem einzigen Chromophor einbezogen. Insgesamt wurden 487 Verbindungen untersucht. Tab. 30 (folgende Seite) zeigt die vorgegebenen Hauptgruppen.

Im folgenden wird beispielhaft die Ergebnisauswertung und -diskussion für die Diskriminanzanalyse der Hauptgruppen etwas ausführlicher dargestellt. Für die nachfolgend auf unteren Hierarchieebenen durchgeführten Diskriminanzanalysen werden dann nur die wichtigsten Ergebnisse erwähnt.

Im ersten Schritt wurde der Wellenlängenbereich für die Diskriminanzanalyse zwischen den Hauptgruppen festgelegt, um eine Beeinträchtigung des Klassifizierungsergebnisses durch spektrales Rauschen jenseits der maximalen Absorptionswellenlänge zu vermeiden. Einige der Hauptgruppen zeigten jedoch über den gesamten Wellenlängenbereich von 200 - 380 nm eine deutliche UV-Absorption, daher wurde dieser Bereich auch für die DA ausgewählt (vgl. auch Abb. 40, S.119).

Tab. 30: Ausgewählte Hauptgruppen für die Klassifizierung mittels Diskriminanzanalyse. Im Feld "Struktur" ist jeweils die größte gemeinsame Struktureinheit wiedergegeben. Die gestrichelten Linien im Siebenring der linken Strukturformel von Hauptgruppe 1 sowie in der Struktur von Gruppe 4 kennzeichnen eine Einfach- oder Doppelbindung. Der Buchstabe A steht für "any atom", an der jeweiligen Stelle ist also die Wahl des betreffenden Atoms freigestellt.

Gruppe	Anzahl Substanzen	Name / Beschreibung	Wirkung	Struktur
1	58	Verschiedene Trizyklen	u.a. Anticholinergika, Antidepressiva, Antiepileptika, Antihistaminika, Hypnotika, Neuroleptika, Sedativa	
2	42	Benzodiazepine	Antiepileptika, Antikonvulsiva, Anxiolytika, Hypnotika, Tranquilizer	
3	49	Phenothiazine	u.a. Anticholinergika, Antidepressiva, Antiemetika, Antihistaminika, Neuroleptika, Parasympatholytika, Spasmolytika, Tranquilizer	
4	26	Opiate	Antitussiva, Analgetika, Narkotika	
5	43	Diphenylmethanderivate	u.a. Analgetika, Antiallergika, Antiasthmatica, Anticholinergika, Antiemetika, Antihistaminika, Herbizide, Hypnotika, Narkotika, Parasympatholytika, Psychostimulantien, Sedativa, Vasodilatoren	
6	25	Barbiturate	Antiepileptika, Hypnotika, Narkotika	
7	107	"Toluolderivate"	ACE-Hemmer, Analgetika, Anorektika, Antiarrhythmika, Antibiotika, Anticholinergika, Antiepileptika, Antihypertensiva, Antikonvulsiva, Antitussiva, Bakterizide, Desinfektionsmittel, MAO-Hemmer, Muskelrelaxantien, Narkotika, Psycholeptika, Psychotropika, Spasmolytika, Stimulantien, Sympathomimetika, Tranquilizer, Vasodilatoren, Vasokonstriktoren	
8	57	Steroide, Typ 1 (Mesityloxytyp)	Anabolika, Androgene und Antiandrogene, Gestagene, Gluko- und Mineralokortikoide	
9	57	Steroide, Typ 2 (Cyclohexadienontyp)	Anabolika, Androgene, Glukokortikoide	
10	23	Herzglykoside	Herzglykoside	

Aufgrund beschränkter Rechenkapazität konnte die DA nur mit einer Schrittweite von 2 nm ausgeführt werden (also mit den Variablen 200 nm, 202 nm, 204 nm ...). Vor dem Hintergrund der bereits angesprochenen Redundanz der im UV-Spektrum enthaltenen Information wurde dies jedoch als unproblematisch bewertet. Des weiteren wurde vor der Analyse die Homogenität der Varianzen mit Box' M-Test geprüft. Da sich diese aufgrund der großen spektralen Unterschiede zwischen den Gruppen als inhomogen erwiesen, wurde die DA auf der Grundlage gruppenspezifischer Kovarianzmatrizen durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.5.5).

Erstes Ergebnis einer Diskriminanzanalyse sind zunächst einmal die errechneten Diskriminanzfunktionen mit den zugehörigen nicht-standardisierten Diskriminanzkoeffizienten für die Berechnung der Diskriminanzwerte aus den ursprünglichen Merkmalswerten für jede Verbindung, sowie die Funktionswerte der Gruppenzentroide. Der besseren Lesbarkeit zuliebe wurden die entsprechenden Tabellen, auch für die in den nachfolgenden Abschnitten durchgeführten Diskriminanzanalysen, im Anhang (Abschnitt 9.3) aufgeführt.

Die Güte einer Klassifikation bemisst sich vor allem nach der Richtigkeit der Gruppenzuordnung. Die optimale Überprüfung bestünde dabei in einer Kreuzvalidierung. Diese Möglichkeit wird durch die Software allerdings nur für den Fall homogener Kovarianzmatrizen angeboten. Daher konnte hier die Beurteilung der Klassifikation nur mit einer einfachen Auftragung der tatsächlichen gegen die durch das Modell vorhergesagte Gruppenzuordnung (s. Tab. 31) erfolgen, bei der das Spektrum der jeweils zuzuordnenden Verbindung im Modell mitenthalten war. Angesichts der relativ großen Gruppenstärken wurde allerdings die Warscheinlichkeit dafür, dass das Hinzufügen bzw. Weglassen eines Spektrums zu wesentlichen Veränderungen des Modells geführt hätte, als eher gering eingeschätzt.

Tab. 31: Klassifizierungsergebnisse für die zehn Hauptgruppen; Auftragung der tatsächlichen gegen die durch das Modell vorhergesagte Gruppenzugehörigkeit. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Zuordnung zu 100 % korrekt.

Tatsächliche Gruppe	Vorhergesagte Gruppe										Gesamt
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	56 (96,6 %)	1 (1,7 %)	0	0	0	0	1 (1,7 %)	0	0	0	58
2	1 (2,4 %)	41 (97,6 %)	0	0	0	0	0	0	0	0	42
3	1 (2,0 %)	0	48 (98,0 %)	0	0	0	0	0	0	0	49
4	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	26
5	0	0	0	0	42 (97,7 %)	1 (2,3 %)	0	0	0	0	43
6	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	25
7	0	0	0	0	0	0	107	0	0	0	107
8	0	0	0	0	0	0	0	57	0	0	57
9	0	0	0	0	0	0	0	0	57	0	57
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	23

Das Klassifizierungsergebnis kann insgesamt als sehr gut bezeichnet werden. 482 Verbindungen (99,0 %) wurden korrekt klassifiziert, nur fünf der insgesamt 487 Substanzen wurden falsch zugeordnet.

Ein weiteres Maß für die Qualität der Klassifizierung ist durch die A-posteriori-Wahrscheinlichkeit $P(g|Y_m)$ bzw. $P(G=g|D=d)$ (Bezeichnung der SPSS-Software) und die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(Y_m|g)$, bzw. $P(D>d|G=g)$ gegeben (vgl. Abschnitt 2.5.5). Diese werden in der Ergebnisausgabe der Statistiksoftware SPSS in der Tabelle "Fallweise Statistiken", die auszugsweise in Tab. 32 wiedergegeben ist, ausgewiesen.

Tab. 32: Auszug aus der Tabelle "Fallweise Statistiken" der SPSS – Ergebnisausgabe. Die Tabelle enthält neben der tatsächlichen Gruppenzugehörigkeit auch die durch den Computer als am wahrscheinlichsten bzw. am zweitwahrscheinlichsten gefundenen Zugehörigkeiten nebst der Wahrscheinlichkeit für diese Zuordnung, $P(D>d | G=g)$. Für die wahrscheinlichste Gruppe stellt der Parameter $P(G=g|D=d)$ die Wahrscheinlichkeit dafür dar, dass die betreffende Verbindung überhaupt einer der Gruppen angehört.

Fallnummer	Tatsächliche Gruppe	Wahrscheinlichste Gruppe	$P(D>d G=g)$	$P(G=g D=d)$	Zweitwahrscheinlichste Gruppe	$P(G=g D=d)$
1	6	6	0,8861	1,0000	1	0,0000
2	1	1	0,9417	1,0000	2	0,0000
3	6	6	0,8549	1,0000	1	0,0000
4	7	7	0,9309	1,0000	1	0,0000
5	7	7	0,4960	0,9996	5	0,0004
:	:	:	:	:	:	:

In allen fünf in Tab. 32 dargestellten Fällen wurden die Verbindungen mit hohen A-Posteriori-Wahrscheinlichkeiten der richtigen Gruppe zugeordnet. Während dagegen bei den ersten vier Verbindungen $P(D>d|G=g)$ zwischen 85 und 95 % betrug und somit die Wahrscheinlichkeit, dass diese Verbindungen überhaupt zu einer der angebotenen Gruppen gehört, sicherlich mehr als akzeptabel war, lag die bedingte Wahrscheinlichkeit bei Fall 5 knapp unter 50 %.

Um ein Gefühl dafür zu entwickeln, welche Streuung der Wahrscheinlichkeitswerte im Falle korrekter Zuordnungen zu erwarten ist, wurden Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Minima und Maxima der A-posteriori- und der bedingten Wahrscheinlichkeiten aller richtig klassifizierten Substanzen berechnet. Diese Berechnungen wurden sowohl für alle 487 Substanzen als auch gruppenweise durchgeführt.

Die bedingte Wahrscheinlichkeit betrug im Mittel über alle Substanzen 57 ± 33 % (einfache Standardabweichung) und unterschied sich für die einzelnen Gruppen nur unmaßgeblich. Die hohe Schwankungsbreite muss zu der Folgerung führen, dass dieser Parameter für die Klärung der Frage, ob eine Substanz überhaupt zu einer der angebotenen Gruppen gehört, kaum herangezogen werden kann. Eine sichere Beantwortung dieser Frage war allerdings angesichts des begrenzten Umfangs der hier vorgestellten Versuche auch nicht unbedingt zu erwarten und fiel für einen größeren Substanzkreis möglicherweise günstiger aus.

Tab. 33 zeigt die Ergebnisse für die A-posteriori-Wahrscheinlichkeiten, also dafür, dass die

Substanzen den jeweils zugeordneten Gruppen angehörten (unter der Annahme, dass sie zwingend einer der Gruppen angehören mussten).

Tab. 33: Deskriptive Statistiken für $P(G=g|D=d)$ für alle 487 Substanzen und für die einzelnen Gruppen.

Substanzen	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Alle Verbindungen	0,514	1,000	0,995	0,034
Gruppe 1	0,534	1,000	0,979	0,076
Gruppe 2	0,514	1,000	0,981	0,077
Gruppe 3	0,602	1,000	0,987	0,059
Gruppe 4	1,000	1,000	1,000	0,000
Gruppe 5	0,862	1,000	0,994	0,023
Gruppe 6	1,000	1,000	1,000	0,000
Gruppe 7	0,948	1,000	0,999	0,007
Gruppe 8	0,957	1,000	0,999	0,006
Gruppe 9	0,906	1,000	0,998	0,012
Gruppe 10	1,000	1,000	1,000	0,000

Der Mittelwert liegt für die Gesamtheit aller Substanzen bei $99,5 \pm 3,4$ % (Standardabweichung) so dass i. d. R. von einer eindeutigen Gruppenzuordnung gesprochen werden kann. Für die Gruppen eins bis drei ergab sich allerdings eine breitere Streuung mit Minimalwerten knapp über 50 %. Dies liegt sicher einerseits in der aus spektroskopischer Sicht engen strukturellen Verwandtschaft zwischen diesen drei Gruppen, andererseits in der großen strukturellen Heterogenität innerhalb der Gruppen begründet. Dies wurde auch im weiteren Verlauf der Untersuchung deutlich (vgl. die Abschnitte 4.6.4 bis 4.6.6).

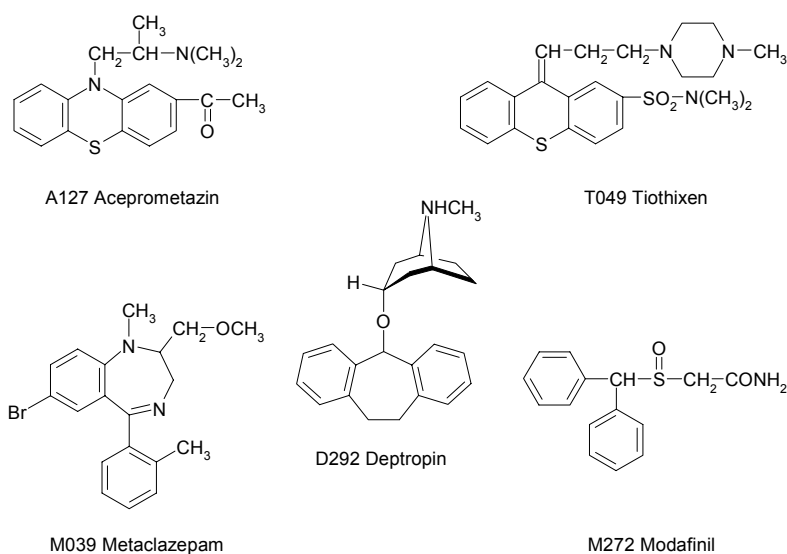


Abb. 39: Namen und Strukturformeln der bei der Diskriminanzanalyse der Hauptgruppen falsch zugeordneten Substanzen.

Die Namen und Strukturformeln der fünf im Rahmen der durchgeführten DA falsch zugeordneten Substanzen sind in Abb. 39 dargestellt, Tab. 34 zeigt die zugehörigen Daten.

Tab. 34: Übersicht über die bei der Diskriminanzanalyse falsch zugeordneten Substanzen

Code	Tatsächliche Gruppe	Wahrscheinlichste Gruppe	$P(D>d G=g)$	$P(G=g D=d)$	Zweitwahrscheinlichste Gruppe	$P(G=g D=d)$
A127	3	1	0,186	0,602	3	0,398
D292	1	7	0,004	0,764	5	0,147
M039	2	1	0,511	0,859	2	0,141
M272	5	6	0,004	0,862	5	0,138
T049	1	2	0,990	1,000	1	0,000

Mit Ausnahme von Deptropin (D292) wurde bei allen Substanzen die korrekte Gruppe als zweitwahrscheinlichste ermittelt. Beim Deptropin handelt es sich um den einzigen Vertreter aus Gruppe 1 (also der Trizyklen), bei dem die beiden aromatischen Ringe nicht durch ein Verbindungsglied (Doppelbindung oder Heteroatom) miteinander verknüpft sind. Es ähnelt daher spektroskopisch gesehen eher den Verbindungen mit zwei isolierten Phenylsystemen. Über die Gründe, warum als wahrscheinlichste Gruppe die einfach substituierten Phenyle und erst als zweitwahrscheinlichste diejenige der Diphenylmethanderivate gefunden wurde, soll hier nicht spekuliert werden. Insgesamt handelt es sich bei diesem Fall weniger um eine falsche Klassifizierung als um einen Grenzfall bei der Eingruppierung im Vorfeld der DA. Die falsche Zuordnung von Aceprometazin ist unverständlich, zumal drei weitere Verbindungen mit Acylphenothiazinstruktur (Acepromazin, Butaperazin und Propionylpromazin) korrekt klassifiziert wurden. Bei Aceprometazin liegt allerdings eine kürzere Seitenkette vor. Ein Blick auf die A-Posteriori-Wahrscheinlichkeiten zeigt, dass die falsche Einstufung mit 60:40 % gegenüber der richtigen hier auch sehr knapp getroffen wurde. Die drei übrigen Verbindungen nehmen in ihrer jeweiligen Gruppe eine Sonderstellung ein: Metaclozepam aufgrund der Methylgruppe am Phenylring, Modafinil und Tiethixen wegen der enthaltenen Sulfon- bzw. Sulfoxidgruppen. Offenbar verändern diese Strukturelemente das UV-Spektrum über das gruppentypische Maß hinaus.

Im folgenden sollen die Charakteristika der durchgeführten Diskriminanzanalyse noch etwas näher untersucht werden:

Wie schon weiter oben erwähnt, wurde für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Diskriminanzanalysen das Verfahren der schrittweisen Diskriminanzanalyse (SDA) eingesetzt. In die SDA der Hauptgruppen wurden insgesamt 26 Variablen/Wellenlängen aufgenommen; im Vergleich mit den weiter unten aufgeführten Diskriminanzanalysen innerhalb der Gruppen sind das relativ viele (auch wenn demnach 155 Variablen nicht berücksichtigt wurden). Die Ursache liegt vermutlich in der Tatsache begründet, dass in Bezug auf das Spektrum sowohl sehr ähnliche als auch sehr unterschiedliche Gruppen einbezogen wurden. Dass die wesentlichen spektralen Eigenschaften trotz Datenreduktion erhalten bleiben, zeigt Abb. 40, in der die ursprünglichen Spektren auch in der reduzierten Darstellung noch gut zu erkennen sind.

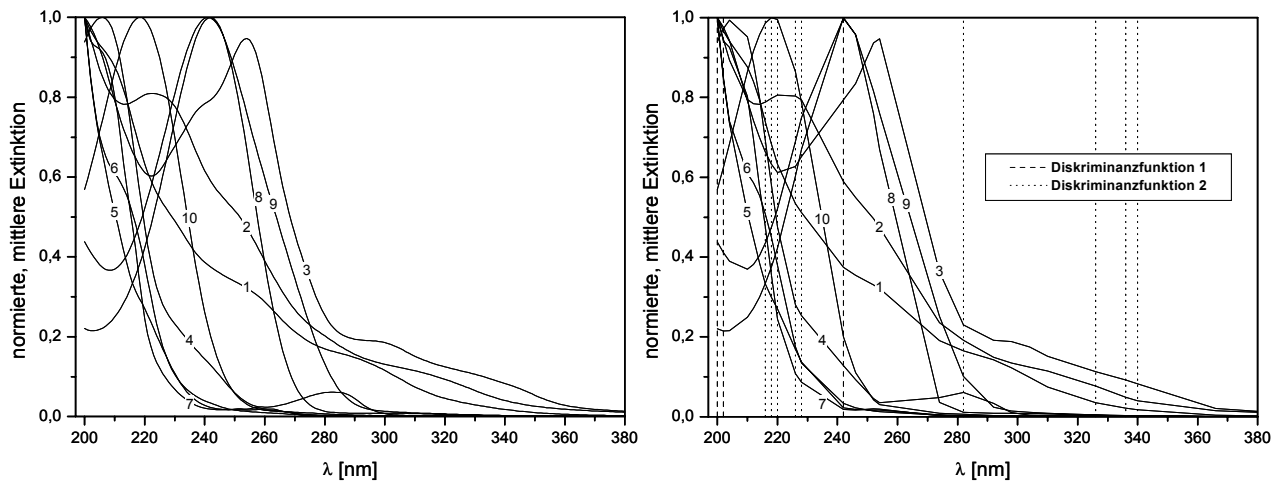


Abb. 40: Links: Darstellung der über alle Gruppenmitglieder gemittelten Spektren für die zehn vorgegebenen Hauptgruppen. Rechts: Darstellung der mittleren Gruppenspektren nur mit den in die Diskriminanzanalyse aufgenommenen Variablen. Die gestrichelten bzw. gepunkteten senkrechten Linien markieren Wellenlängen mit großer diskriminatorischer Bedeutung für die jeweilige Diskriminanzfunktion.

Die eingetragenen senkrechten Linien kennzeichnen diejenigen Wellenlängen, die in der jeweiligen Diskriminanzfunktion ein Maximum an diskriminatorischer Bedeutung besitzen. In der Ergebnisausgabe der Statistiksoftware lassen sich diese Angaben der sog. Strukturmatrix entnehmen, die in Tab. 35 aus Platzgründen nur in Auszügen wiedergegeben ist. Dort findet sich die Korrelation jeder Variablen mit allen Diskriminanzfunktionen. Dabei weist ein hoher Absolutwert der Korrelation darauf hin, dass die betreffende Variable für diese Diskriminanzfunktion eine wichtige Rolle spielt.

Tab. 35: Auszug aus der Strukturmatrix als Ergebnis der Diskriminanzanalyse der zehn Hauptgruppen. Y_m bezeichnet jeweils die m-te Diskriminanzfunktion. Die Zahlenwerte geben die Korrelation der jeweiligen Variablen mit den Y_m an, ein hoher Absolutwert steht für eine große diskriminatorische Bedeutung der betreffenden Variablen in dieser Diskriminanzfunktion.

Variable	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	...
242 nm	-0,530	0,346	0,240	0,062	...
200 nm	0,504	0,059	0,398	-0,361	...
202 nm	0,471	0,139	0,272	-0,119	...
220 nm	-0,042	0,407	-0,320	-0,208	...
218 nm	0,022	0,386	-0,336	-0,138	...
216 nm	0,094	0,352	-0,336	-0,043	...
326 nm	0,010	0,262	0,202	0,122	...
:	:	:	:	:	...

Von den in die SDA der Hauptgruppen einbezogenen Wellenlängen waren in der Reihenfolge abnehmender Bedeutung für die erste Diskriminanzfunktion Y_1 : 242, 200 und 202 nm und für Y_2 : 220, 226, 228 218, 216, 326, 336, 340 und 282 nm diejenigen Variablen mit den betragsmäßig größten Korrelationswerten. Dies deckt sich mit den Bereichen der größten Spektrenunterschiede in Abb. 40.

Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass zwischen den Spektren einzelner Gruppenmitglieder und den gemittelten Gruppenspektren z. T. große Unterschiede bestehen können. Dies wird insbesondere auch in den nachfolgenden Abschnitten dieser Arbeit deutlich. Gleichwohl eignet sich die Darstellung der gemittelten Gruppenspektren für die Interpretation der DA, da sie deren auf die Gruppenunterschiede ausgerichteten Blickwinkel einnimmt.

Die Diskriminanzfunktionen trennen zwischen den Gruppen mit abnehmender Stärke (vgl. Abschnitt 2.5.5). Tab. 36 zeigt die für die SDA der Hauptgruppen ermittelten Kennzahlen.

Tab. 36: Beschreibung der Varianz durch die Diskriminanzfunktionen Y_m .

Funktion	Eigenwert	% der Varianz	Kumulierte %	Kanonische Korrelation
Y_1	40,245	64,9	64,9	0,988
Y_2	10,860	17,5	82,4	0,957
Y_3	5,272	8,5	90,9	0,917
Y_4	1,992	3,2	94,1	0,816
Y_5	1,496	2,4	96,5	0,774
Y_6	1,165	1,9	98,4	0,734
Y_7	0,491	0,8	99,2	0,574
Y_8	0,307	0,5	99,6	0,484
Y_9	0,218	0,4	100,0	0,423

Für die erste Diskriminanzfunktion Y_1 beträgt die Streuung zwischen den Gruppen gut das Vierzigfache der Streuung innerhalb der Gruppen (Eigenwert). Diese große Trennkraft der Gruppen wird durch den hohen Anteil der beschriebenen an der gesamten Varianz (64,9 %) bestätigt. Der kanonische Korrelationskoeffizient, der die Korrelation zwischen den Diskriminanzwerten (dieser Diskriminanzfunktion) und der Gruppenzugehörigkeit wiedergibt, liegt ebenfalls nahe bei Eins. Die beiden ersten Diskriminanzfunktionen Y_1 und Y_2 erklären zusammen 82,4 % der Varianz in den Daten, andererseits werden die ersten fünf Funktionen benötigt, um mehr als 95 % der Streuung widerzuspiegeln.

In Abb. 41 sind die Funktionswerte der untersuchten 487 Substanzen gegeneinander aufgetragen. Da bei derartig vielen Messpunkten eine gewisse Unübersichtlichkeit nicht zu vermeiden war, wurde im rechten Teil der Abbildung die Lage der Gruppenzentroide gesondert eingetragen.

Y_1 trennt vor allem zwischen den Gruppen 8 und 9 einerseits und den restlichen Gruppen andererseits. Die zwei hervortretenden spektroskopischen Merkmale dafür sind eine vergleichsweise geringe Extinktion an der Untergrenze des Spektrums bei 200 bzw. 202 nm sowie ein ausgeprägtes Maximum bei 242 nm (vgl. auch Tab. 35, S. 119 und Abb. 40, S. 119). Die Gruppen 5 und 7 liegen wegen der geringen Absorption bei 242 nm bei sehr hohen Werten von Y_1 , die Gruppen 1 bis 3 etwas besser. Y_2 trennt im höheren Wellenlängenbereich die Gruppen 1 bis 3 vom Rest ab; der Bereich zwischen 216 und 228 nm ist vielleicht eher allgemein ein Bereich mit hoher Trennung zwischen den Gruppen.

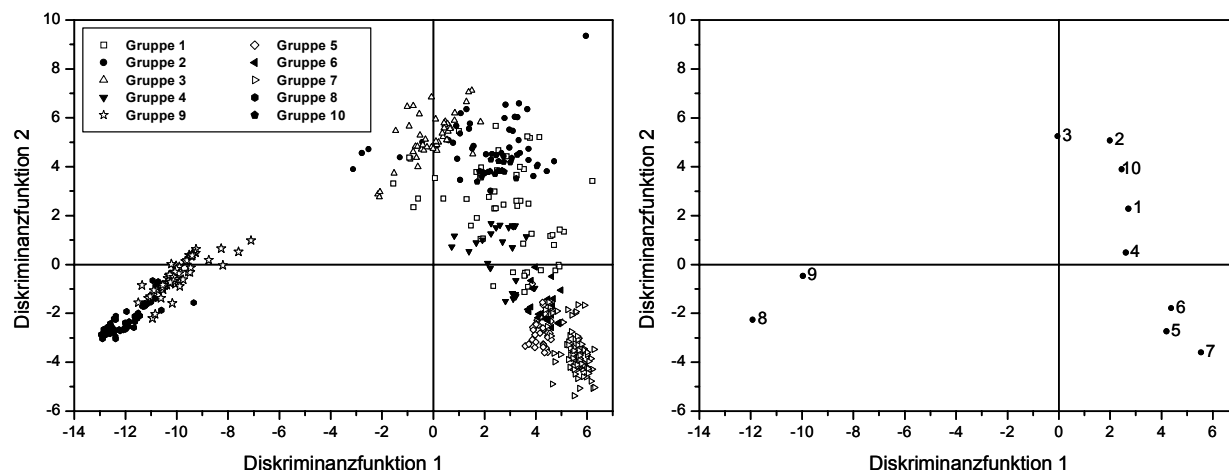


Abb. 41: Auftragung der Diskriminanzwerte der untersuchten Substanzen in der durch die ersten beiden Diskriminanzfunktionen aufgespannten Ebene. Links: Koordinaten sämtlicher untersuchter 487 Substanzen, rechts: Lage der Gruppenzentroide.

Die Auftragung nur der ersten beiden Diskriminanzfunktionen verkürzt die Sicht auf die erzielten Ergebnisse. Die Auftragung von Y_4 gegen Y_3 in Abb. 42 verdeutlicht beispielsweise die Trennung der in Abb. 41 recht eng beieinander liegenden Hauptgruppen 1, 3 und 10: während Y_3 die Gruppe 10 gut von den anderen beiden trennt, unterscheidet Y_4 vor allem zwischen Gruppe 3 und 10 einerseits und Gruppe 1 andererseits, wobei diese Trennung nicht so eindeutig verläuft. Insgesamt sollte bedacht werden, dass die volle Trennung erst im neundimensionalen Diskriminanzraum erzielt wurde.

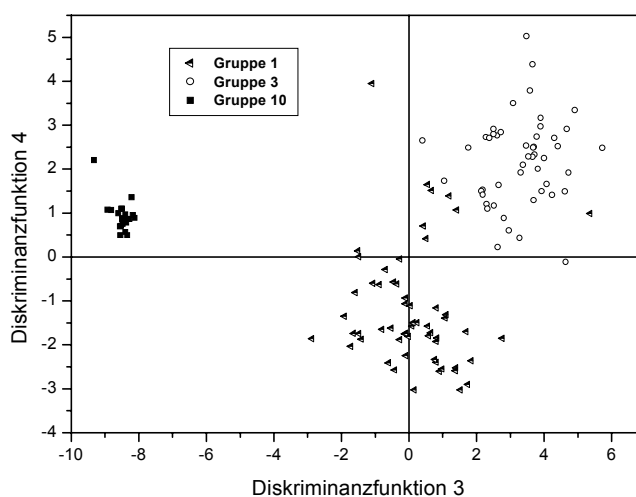


Abb. 42: Auftragung der Funktionswerte von Y_4 gegen Y_3 für die Hauptgruppen 1, 3 und 10.

Die Strukturmatrix weist für Y_3 die Wellenlängen 252 und 254 nm als besonders relevant aus, bei denen das mittlere Spektrum der Gruppe 10 im Vergleich zu denjenigen der anderen beiden Gruppen nur eine geringe Absorption zeigt. Für Y_4 konnten allerdings einzelne Wellenlängen nicht mehr so deutlich hervorgehoben werden.

Als Zwischenergebnis lässt sich festhalten, dass die charakteristischen Unterschiede zwischen

den Spektren der ausgewählten Hauptgruppen durch die Diskriminanzanalyse mehr als befriedigend erkannt wurden. Dabei deckt sich die Auswahl der als besonders relevant erkannten Wellenlängen mit derjenigen, die auch ein menschlicher Betrachter vermutlich vornehmen würde.

Im folgenden wurde die weitergehende Ausdifferenzierung der Hauptgruppen untersucht. Dabei wurde ein Bezeichnungssystem gewählt, bei dem die einzelnen Stufen der Ebenen dieser hierarchischen Differenzierung wie in einer Textgliederung durchnummeriert wurden. So kennzeichnen die Bezeichnungen 2.1.1 bis 2.1.3 beispielsweise die drei Untergruppen (der dritten Ebene) zur ersten Untergruppe (zweite Ebene) von Hauptgruppe 2 (erste Ebene).

4.6.4 Trizyklische Verbindungen

Hauptgruppe 1 erwies sich als strukturell extrem heterogen. In Voruntersuchungen durchgeführte Diskriminanzanalysen ergaben, dass eine einfache Unterteilung, z. B. nach den enthaltenen Heteroatomen, nach der Grundstruktur (Dibenzocyclohexan- und -heptanderivate) oder nach Verbindungen mit substituierten bzw. eben nicht substituierten aromatischen Ringsystemen nur unbefriedigende Klassifikationsquoten ergab (60, 76 bzw. 85 %).

Gleichzeitig bestand das Problem, dass komplexere spektrale Verwandtschaftsbeziehungen durch bloßes Übereinanderlegen der Strukturen teilweise nicht zu erkennen waren. So kann die Diskriminanzanalyse Spektren nur aufgrund der ausgewählten Variablen vergleichen, dabei werden vom Kurvenverlauf her ähnliche, aber beispielsweise stark bathochrom verschobene Spektren (z. B. bei heteroanalogen Verbindungen) nur bedingt als ähnlich erkannt. Hierin spiegelt sich erneut die Dualität zwischen taxonomischer und kausaler Sichtweise auf die Daten wider (vgl. Abschnitt 2.5.1). Abb. 43 zeigt dies am Beispiel dreier heteroanaloger Verbindungen, wie sie gerade in dieser Gruppe vielfach zu finden waren.

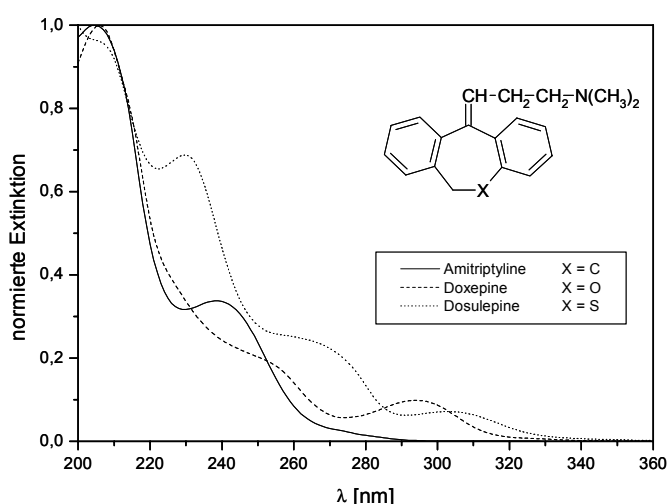


Abb. 43: Darstellung der Spektren dreier heteroanaloger Antidepressiva. Deutlich zu erkennen ist die zunehmende Rechtsverschiebung (bathochromer Shift) bei Ersatz des mit X gekennzeichneten Kohlenstoffatoms durch Sauerstoff (Doxepin) bzw. Schwefel (Dosulepin). Während letzteres im betrachteten Spektralbereich vier Maxima bzw. ausgeprägte Schultern aufweist, fällt beim Doxepin das erste Maximum bereits in den Bereich < 200 nm. Beim Amitriptylin sind nur noch zwei Maxima erkennbar. Die unterschiedliche Höhe der korrespondierenden Banden ist u.a. auf die Normierung der Spektren zurückzuführen.

Insgesamt wurde in der Gruppe 1 eine schier unüberschaubare strukturelle und spektroskopische Vielfalt vorgefunden. Bei einer im Vorfeld durchgeführten Clusteranalyse verteilten sich die 58 Gruppenmitglieder auf 37 Gruppen mit deutlich voneinander unterscheidbaren Spektren. Dies bedeutete im Umkehrschluss aber auch, dass jede dieser Untergruppen im Schnitt nur aus knapp zwei Vertretern bestand.

Um die große strukturelle und spektroskopische Heterogenität der Gruppe 1 überhaupt einigermaßen zu bewältigen, sollte zunächst eine Unterteilung in einige wenige Untergruppen erfolgen. Wichtig war dabei weniger die Frage eines eindeutigen Zusammenhangs zwischen Untergruppe und chemischer Struktur, sondern vielmehr eine eindeutige Zuordnung durch die Diskriminanzanalyse. Substanzen mit hochgradiger struktureller Übereinstimmung sollten allerdings nicht auf verschiedene Untergruppen verteilt werden.

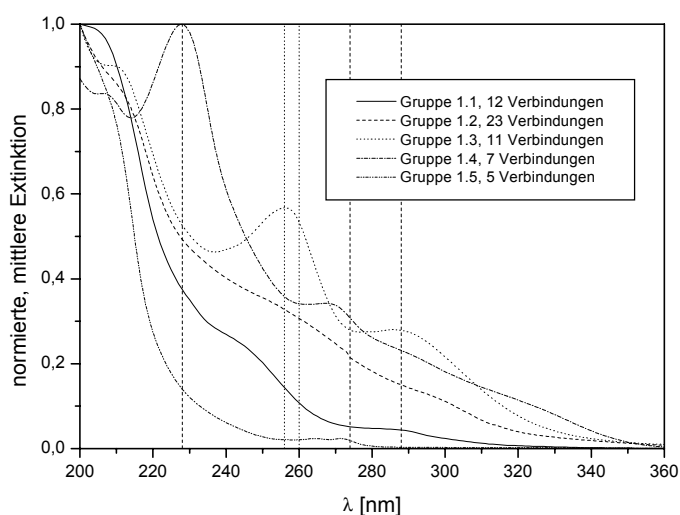


Abb. 44: Gemittelte Spektren der Gruppen 1.1 bis 1.5. Die senkrechten gestrichelten Linien bezeichnen die wichtigsten Wellenlängen für die erste Diskriminanzfunktion, die gepunkteten diejenigen für die zweite.

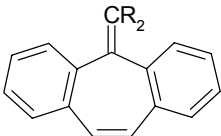
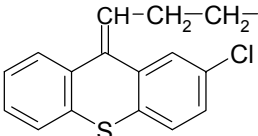
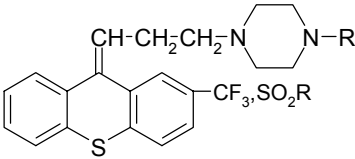
Mit der in Abb. 44 gezeigten Aufteilung in fünf Untergruppen (1.1 bis 1.5) wurde im Wellenlängenbereich von 200 – 360 nm eine zu 100 % korrekte Klassifizierung erhalten. Zwar zeigten innerhalb der fünf Gruppen einzelne Spektren z. T. erhebliche Abweichungen vom mittleren Spektrum, es gab jedoch auch wesentliche Gemeinsamkeiten innerhalb der Gruppen, die in dieser Darstellung besonders gut zum Ausdruck kommen. So zeigte Gruppe 1.2 bei z. T. ähnlichem Spektrenverlauf i. d. R. eine deutlich höhere Gesamtabsorption im untersuchten Wellenlängenbereich als Gruppe 1.1. Während die Mitglieder der Gruppe 1.3 sich nach vorangehenden Minima durch deutliche Maxima im Bereich von 260 oder 290 nm auszeichneten, besaßen sämtliche Vertreter der Gruppe 1.4 ein intensives Maximum im Bereich 220 - 240 nm.

Die Gruppe 1.5 nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als dass sie die einzige der fünf Gruppen war, bei der ein eindeutiger struktureller Bezug hergestellt werden konnte. Hier bestand offenbar keinerlei Konjugation zwischen den beiden aromatischen Ringsystemen, so dass die Verbindungen spektroskopisch mit solchen gleichzusetzen waren, die über zwei isolierte, mehrfach substituierte Phenylchromophore verfügen. Es ist hier sogar die typische

Vibrationsfeinstruktur des Benzolgrundkörpers erhalten geblieben (in Abb. 44 nur ansatzweise zu erkennen).

Die weitere Aufteilung in Untergruppen erfolgte derart, dass nur Substanzen mit wirklich geringen spektralen Unterschieden derselben Gruppe zugeschlagen wurden, wobei einige der oben erwähnten 37 Cluster noch zusammengefasst wurden, so dass sich schließlich insgesamt 24 Untergruppen ergaben. Die Grundstrukturen der in ihnen enthaltenen Substanzen sind im Anhang, Abschnitt 9.3.2, zu finden. Exemplarisch ist in Tab. 37 die Unterteilung für die Gruppe 1.4 gezeigt.

Tab. 37: Aufspaltung der Gruppe 1.4 in drei weitere Untergruppen.

Gruppe	Struktur	Anzahl
1.4.1		2
1.4.2		2
1.4.3		3

Zu erkennen ist die bereits große strukturelle Ähnlichkeit zwischen 1.4.2 und 1.4.3. Trotzdem unterscheiden sich die Spektren deutlich, wie Abb. 45 zeigt. In den anderen Untergruppen der Gruppe 1 war die Situation vergleichbar.

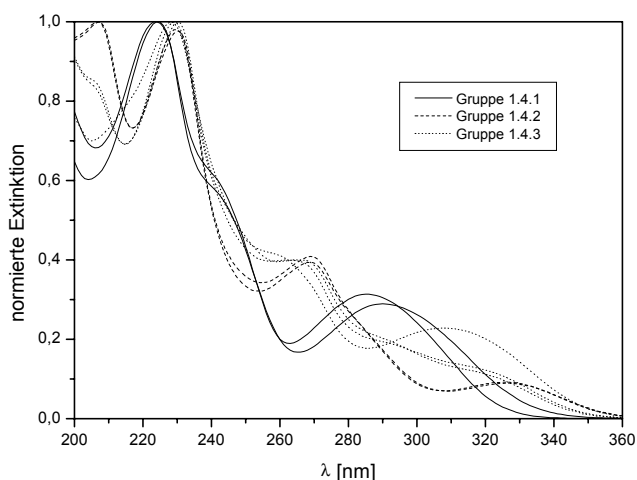


Abb. 45: Spektren der Gruppen 1.4.1 bis 1.4.3

Angesichts der geringen Substanzzahlen pro Gruppe wurde auf die Durchführung einer Diskriminanzanalyse mit fraglichem Aussagewert verzichtet. Eine eingehendere Untersuchung der Beziehungen zwischen Struktur und Absorption unterblieb aus dem gleichen Grund. Die hier erfolgten Vorarbeiten waren allerdings nicht nutzlos: mit ihrer Hilfe und unter Verwendung der angelegten Strukturdatenbank werden im "Ernstfall" zumindest bei Vorliegen eines konkreten Verdachts u. U. weiterführende Hinweise über vorhandene Strukturelemente gewonnen.

4.6.5 Benzodiazepine

Im Gegensatz zur Hauptgruppe 1 ließ sich bei Hauptgruppe 2 ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und der Aufteilung auf unterscheidbare Untergruppen feststellen. Gruppe 2.1 wurde dabei von Verbindungen gebildet, bei denen an den Siebenring der Benzodiazepingrundstruktur ein weiterer ungesättigter Stickstoffheterozyklus annelliert war (Midazolamtyp bzw. Alprazolam-/Triazolamtyp), die Vertreter der anderen vier Untergruppen unterschieden sich im Substituenten an Position 7 des Benzodiazepingerüsts. Die gemeinsamen Strukturen und die gemittelten Spektren der Gruppen 2.1 bis 2.4 sind in Abb. 46 dargestellt.

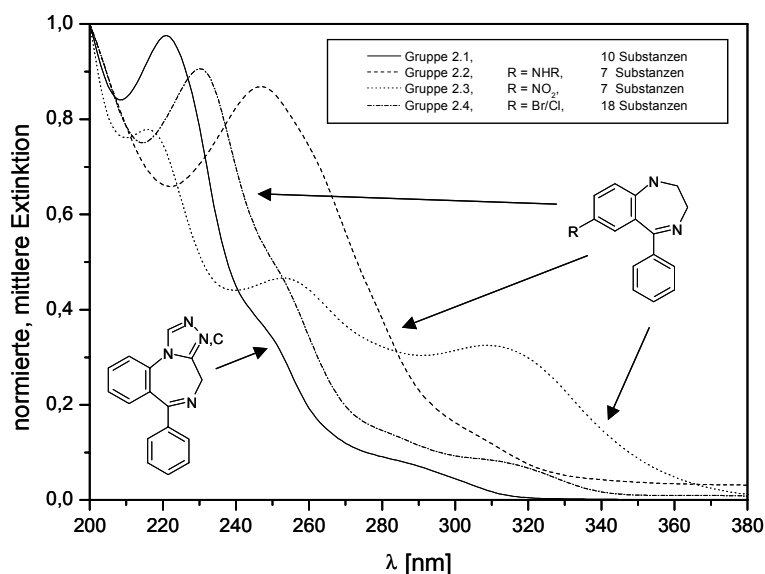


Abb. 46: Gemittelte Spektren der Untergruppen zur Hauptgruppe 2 (Benzodiazepingruppe). Die Strukturformeln geben jeweils den "kleinsten gemeinsamen Nenner" der jeweiligen Gruppen wieder, variable Substituenten an anderen Positionen wurden weggelassen.

Die Tatsache, dass sich die Gruppen 2.1 und 2.4 mehr ihrer Lage als ihrer Form nach unterschieden, kann mit dem Umstand begründet werden, dass sämtliche Mitglieder von 2.1 ebenfalls in Position 7 des Benzodiazepingerüsts chloresubstituiert waren. Somit konnte dieser Substitutionsort als wesentlicher Faktor für die Gestalt des Spektrums der Benzodiazepine (und ihrer Metabolite) ermittelt werden. Die im Wellenlängenbereich von 200 - 380 nm durchgeführte SDA konnte den vier Gruppen sämtliche Substanzen fehlerfrei zuordnen. Abb. 47 zeigt die weitere Untergliederung, sie wurde durch Überlagerung aller Spektren der jeweiligen Gruppe und anschließendes Zusammenfassen der visuell ähnlichsten Spektren gewonnen.

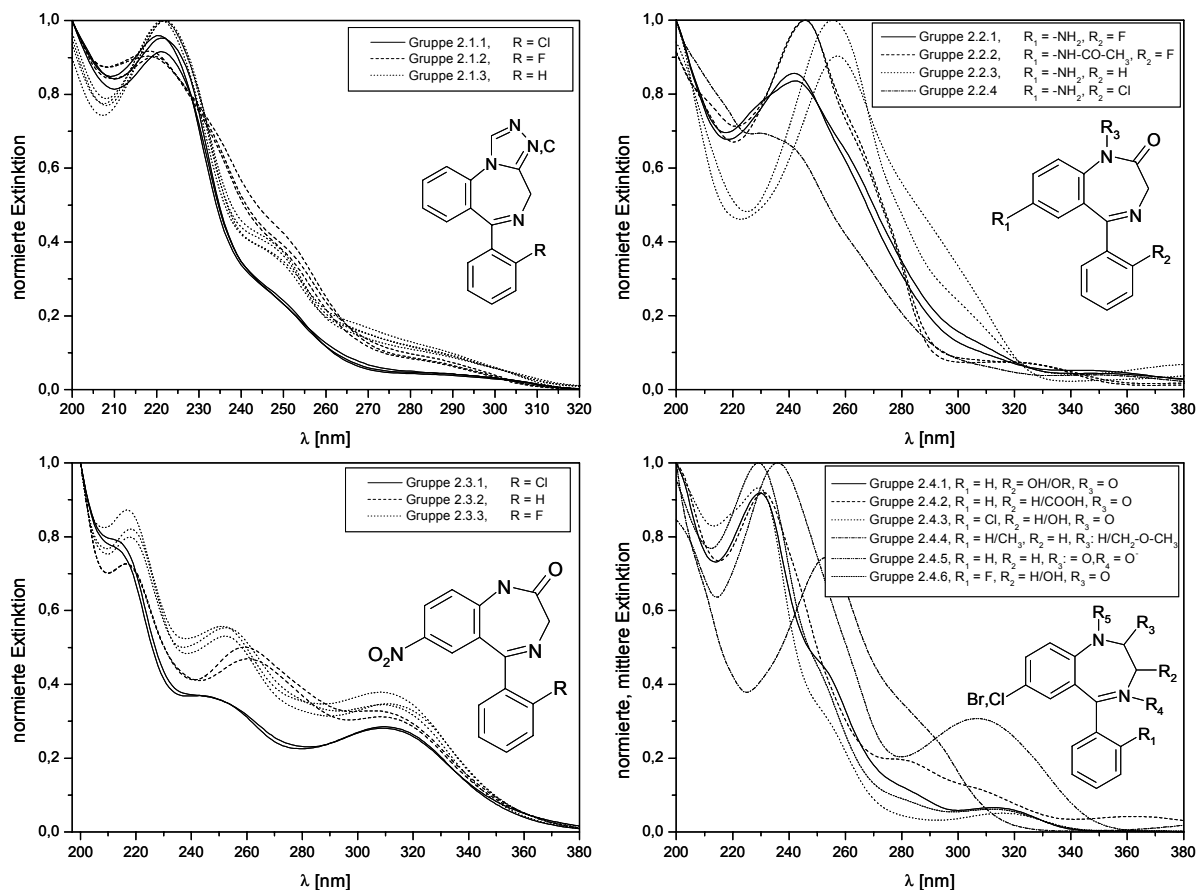


Abb. 47: Spektren und Strukturen der Gruppen 2.1.1. bis 2.4.6. Der Übersichtlichkeit halber wurden für die Gruppen 2.4.1 bis 2.4.6 die gemittelten Spektren dargestellt.

Eine Überprüfung mittels SDA ergab einhundertprozentige Zuordnungsquoten für die Untergruppen von Gruppe 2.1 und 2.3, bei 2.2 und 2.4 wurde jeweils eine "alleinstehende" Verbindung einer anderen Gruppe zugeschlagen (dies scheint ein grundsätzliches Problem beim Auftreten von "Ein-Element-Gruppen" zu sein). Der Aussagewert einer DA bei solch geringen Substanzzahlen pro Gruppe ist allerdings so begrenzt, dass darauf verzichtet wurde, die entsprechenden Ergebnisse in diese Arbeit aufzunehmen. Angesichts der Resultate aus den anderen Gruppen sollte bei Neuaufnahme weiterer Verbindungen eine gute Klassifizierung jedoch ebenfalls möglich sein.

4.6.6 Phenothiazine

Obwohl diese Gruppe strukturell sozusagen einen Sonderfall der Hauptgruppe 1 darstellt, ist die spektrale Vielfalt immer noch erstaunlich hoch. Analog wurde hier die Vorgehensweise gewählt, zur Vorsortierung auf der zweiten Ebene zunächst einige wenige Gruppen zu formulieren, die zu 100 % korrekt klassifiziert werden sollten. Im Gegensatz zur Hauptgruppe 1 war in diesem Fall eine Einteilung nach Strukturmerkmalen in drei Untergruppen möglich (Abb. 48).

Wie schon in Hauptgruppe 1 wichen einzelne Spektren, insbesondere in den Gruppen 3.2 und 3.3, z. T. erheblich von den hier dargestellten gemittelten Kurven ab.

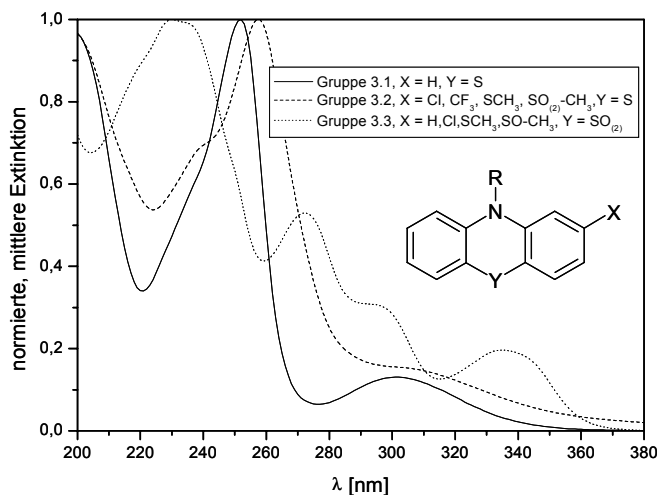


Abb. 48: Gemittelte Spektren der Gruppen 3.1 bis 3.3.

Gruppe 3.1 präsentierte sich dagegen als bereits vergleichsweise homogen. Trotzdem werden erneut einige Charakteristika gut wiedergegeben. So zeigten die Mitglieder der Gruppe 3.2 im Vergleich zu 3.1 deutlich stärkere Schultern bzw. Maxima im Bereich zwischen 220 und 245 nm. Die Spektren der Gruppe 3.3 hoben sich durch eine deutlich höhere Anzahl von Maxima und/oder eine ausgeprägte Bande zwischen 330 und 350 nm von denen der anderen Gruppen ab.

Die zugehörige (schrittweise) Diskriminanzanalyse (Abb. 49) trennte sehr klar zwischen den Gruppen und konnte 100 % der Gruppenmitglieder korrekt zuordnen.

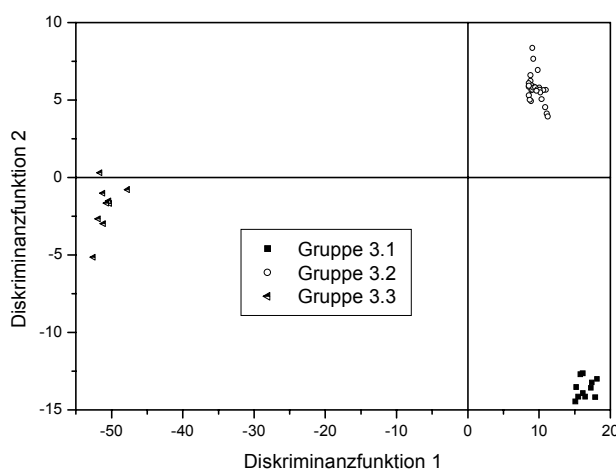


Abb. 49: Darstellung der Funktionswerte der Hauptgruppe 3 im zweidimensionalen Diskriminanzraum.

Da in diesem Fall drei Gruppen gefunden wurden, ergaben sich insgesamt nur zwei Diskriminanzfunktionen, so dass eine vollständige Darstellung der Trennung in der Papierebene möglich war. Abb. 50 zeigt die zwei Untergruppen 3.1.1. und 3.1.2.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit des Spektrenverlaufs waren in diesem Fall die Kovarianzmatrizen homogen, so dass das Klassifizierungsergebnis mittels Kreuzvalidierung überprüft werden konnte. Sämtliche elf Substanzen wurden dabei korrekt zugeordnet.

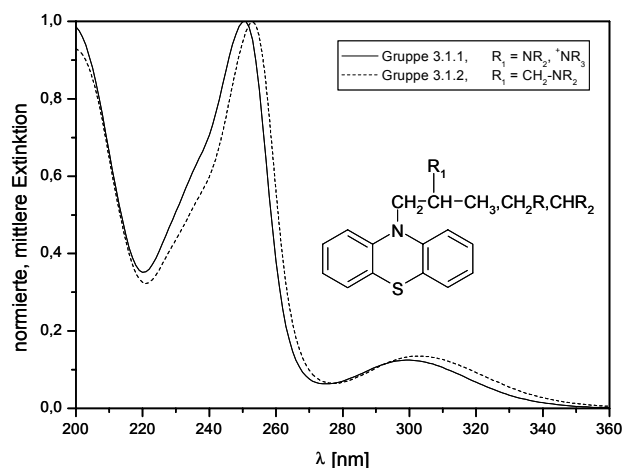


Abb. 50: Gemittelte Gruppenspektren der Gruppen 3.1.1 und 3.1.2.

Die Gruppe 3.2 ließ sich nach Substitution in Position 2 des Phenothiazingrundgerüsts in drei Untergruppen ausdifferenzieren: Gruppe 3.2.1 umfasste Verbindungen mit Acylgruppe, Gruppe 3.2.2 solche mit elektronegativen Substituenten wie Cl, CF₃ oder OCH₃, die Mitglieder der Gruppe 3.2.3 schließlich trugen an dieser Position CN-, SR- oder SO₂R-Gruppen. Nicht nur diese Unterteilung konnte mittels DA zu 100 % korrekt nachvollzogen werden, innerhalb der drei Gruppen der dritten Ebene konnte anschließend noch einmal zwischen den genannten Substituenten getrennt werden. Dies ist in Abb. 51 für die Gruppe 3.2.3 dargestellt.

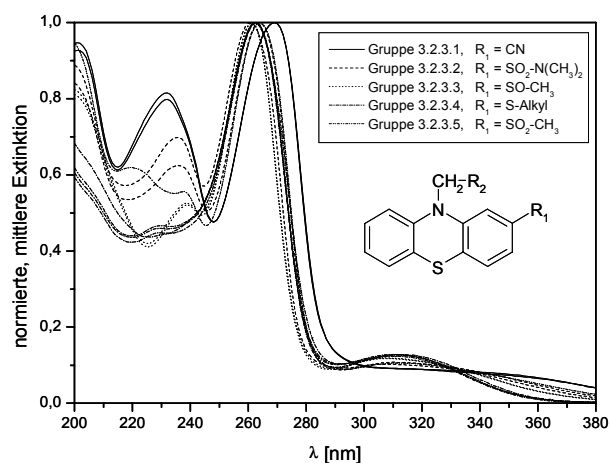


Abb. 51: Unterscheidbarkeit der Spektren in Gruppe 3.2.3.

Die Verbindungen mit schwefelhaltigem Substituenten unterscheiden sich untereinander im Bereich > 250 nm kaum (obwohl im R₂ der Seitenkette durchaus strukturelle Unterschiede vorhanden sind), unterhalb 250 nm sind allerdings deutliche Unterschiede auszumachen, Sulfone und Sulfoxide zeigen eine zusätzliche, kleinere Bande bei 235 - 240 nm. Erneut wurde eine DA auf dieser Ebene wegen der geringen Substanzzahl nicht mehr durchgeführt.

Für Gruppe 3.3 ergab sich ebenfalls eine weitere Aufspaltung in fünf Untergruppen bzw. einzelne Verbindungen mit gut unterscheidbaren Spektren. Maßgeblich war dabei neben dem

Oxidationsgrad des Ringschwefels erneut die Substitution in Position 2 des Phenothiazingerüsts. Wegen der geringen Substanzzahl wurde hier ebenfalls auf die Durchführung einer DA verzichtet.

4.6.7 Opiate

Die Spektren der Opiatgruppe unterschieden sich voneinander nicht in dem bei den vorangegangenen Gruppen festgestellten Maß. Die bei den hier untersuchten Verbindungen variablen Strukturelemente mit Einfluss auf das Spektrum zeigt Abb. 52.

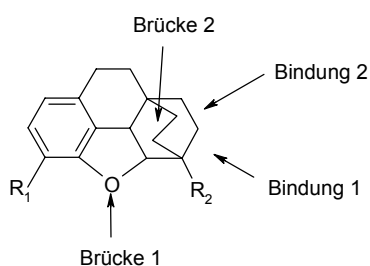


Abb. 52: Strukturelle Einflussfaktoren auf die UV-Spektren der Opiate.

Dementsprechend konnten sechs Untergruppen ermittelt werden, deren gemittelte Gruppenspektren in Abb. 53 wiedergegeben sind.

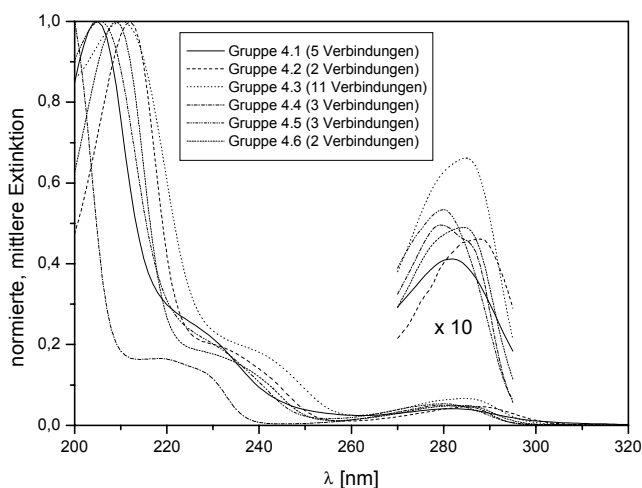


Abb. 53: Gemittelte Gruppenspektren der Gruppen 4.1 bis 4.6.

Eine Übersicht über die strukturellen Eigenheiten der jeweiligen Gruppen gibt Tab. 38. Bei Gruppe 4.5 bleibt unklar, wieso diese doch recht verschieden substituierten Verbindungen so ähnliche Spektren zeigen. Möglicherweise gibt es Parallelen in der dreidimensionalen Molekülstruktur, die sich aus der zweidimensionalen Darstellung nicht erschließen.

Tab. 38: Charakteristische Strukturmerkmale der Gruppen 4.1 bis 4.6.

Gruppe	Charakteristische Struktur
4.1	R_2 ist =O
4.2	Brücke 2 vorhanden (bei den anderen nicht)
4.3	Bindung 2 ist eine Doppelbindung
4.4	Brücke 1 fehlt (bei den anderen vorhanden)
4.5	$R_1 = R_2 = \text{OAc}$ (Heroin) / $R_1 = \text{OAc}$, $R_2 = \text{O-Alkyl}$ und zusätzlich ist Bindung 1 eine Doppelbindung (Thebacon) / $R_1 = \text{OH}$, R_2 ist =CH ₂ (Nalmefen)
4.6	$R_2 = \text{OH}$, Bindungen 1 und 2 sind Einfachbindungen und Brücke 1 ist vorhanden

Auch hier gelang es jedoch, mittels DA die enthaltenen Verbindungen zu 100 % korrekt zuzuordnen. Durch die ersten beiden Diskriminanzfunktionen wurde dabei schon 98,1 % der Gesamtvarianz erfasst, was auch durch Abb. 54 unterstrichen wird.

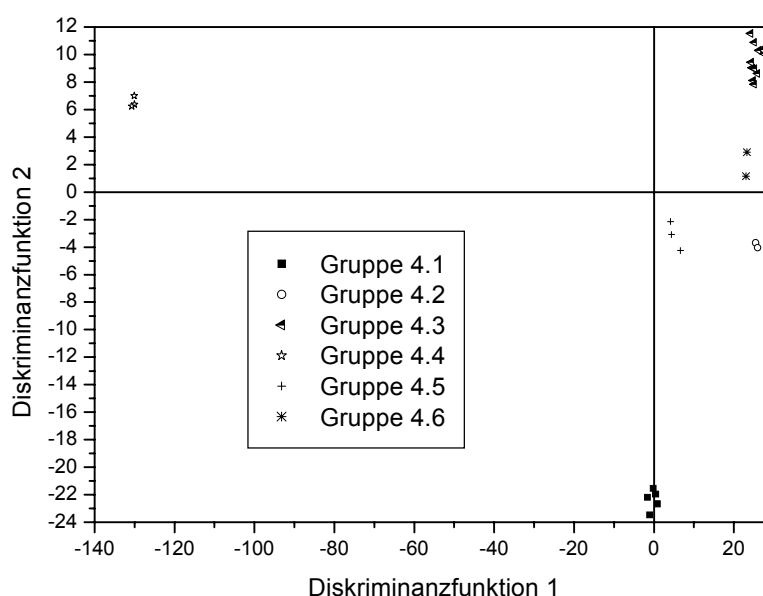


Abb. 54: Darstellung der Diskriminanzwerte der Gruppen 4.1 bis 4.6 in der Ebene der ersten beiden Diskriminanzfunktionen.

Erneut ist zu sehen, dass die Gruppen 4.1 und 4.4, deren Spektren sich auch für das menschliche Auge von denen der anderen Gruppen am deutlichsten unterscheiden, auch durch die DA am weitesten abgetrennt werden. Auch hier gilt allerdings wieder, dass aufgrund der teilweise relativ geringen Substanzzahl in den Gruppen von zu weitgehenden Schlussfolgerungen abgesehen werden sollte.

4.6.8 Diphenylmethanderivate

Die 43 Mitglieder dieser Gruppe ließen sich aufgrund ihrer Struktur (Tab. 39) auf der zweiten Hierarchieebene in drei Untergruppen unterteilen, denen sie durch die DA zu 100 % korrekt zugeordnet werden konnten. Die gemittelten Gruppenspektren sind in Abb. 55 wiedergegeben.

Tab. 39: Charakteristische Strukturelemente der Gruppen 5.1 bis 5.3.

Gruppe	Strukturelement (H und andere Reste sind weggelassen)
5.1	$(\text{H}_5\text{C}_6)_2\text{C}=\text{C}=\text{O}$
5.2	$(\text{H}_5\text{C}_6)_2\text{C}-\text{R}$
5.3	$(\text{H}_5\text{C}_6)_2\text{C}-\text{C}=\text{N}$

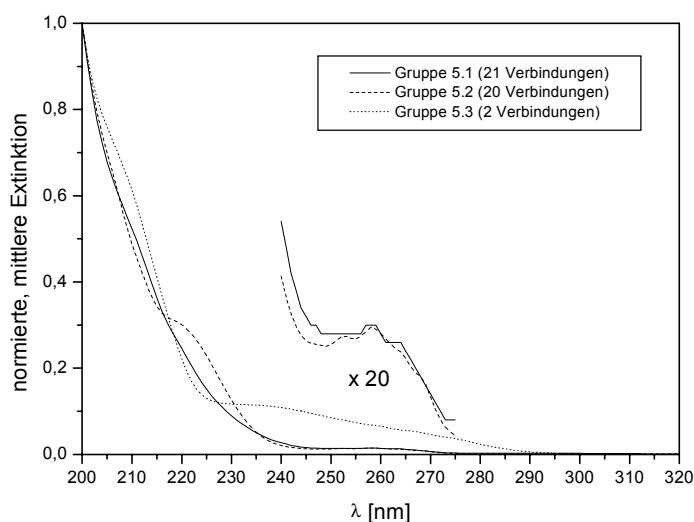


Abb. 55: Gemittelte Gruppenspektren der Gruppen 5.1 bis 5.3.

Beim Versuch einer weiteren Untergliederung von Gruppe 5.1 zeigten sich auch die Grenzen der hier vorgestellten Methode: bei ansonsten weitgehend identischem spektralen Verlauf wurden durch die DA feine Unterschiede in der Schwingungsfeinstruktur sowie teilweise auch spektrales Rauschen überbewertet. Bei Gruppe 5.2 wurden anhand der überlagerten Spektren der betreffenden Verbindungen zwar deutlichere Unterschiede festgestellt, so dass insgesamt noch einmal fünf Untergruppen aufgefunden wurden. Wegen der geringen Substanzzahlen wurde aber auch hier von einer DA abgesehen.

4.6.9 Barbiturate

Die Gruppeneinteilung erfolgte ausgehend von einer Überlagerung aller Spektren dieser Gruppe nach dem in Tab. 40 dargestellten Schema. Die dort aufgeführten Substituenten befinden sich in Position 5 des Barbituratgerüsts. Die gemittelten Gruppenspektren sind in Abb. 56 wiedergegeben.

Die Zuordnung durch die Diskriminanzanalyse erfolgte für die ersten vier Gruppen zu 100 % korrekt, allerdings wurde Gruppe 5 (nur eine Verbindung) durch die Software nicht als eigenständige Gruppe akzeptiert und Gruppe 6.1 zugeschlagen. Dies scheint ein weiterer Beleg dafür zu sein, dass "Gruppen", die nur aus einer Verbindung bestehen, zu Fehlern bei der DA führen können. Aufgrund der hohen spektralen Ähnlichkeit innerhalb der Gruppen wurde auf eine weitere Unterteilung verzichtet.

Tab. 40: Charakteristische Strukturelemente der Gruppen 6.1 bis 6.5

Gruppe	Substituenten	Anzahl
6.1	Mindestens ein Allylsubstituent, ein Vinylsubstituent oder ein am C ₁ verzweigter längerkettiger Alkylrest (mindestens 2-Butyl)	12
6.2	Nur einfache, nicht am C ₁ verzweigte Alkylreste oder Acetylrest (bei letzterem mit leicht abweichendem Spektrum)	5
6.3	Methylgruppe am N ₁ der Barbitursäure	4
6.4	2-Bromprop-2-en-1-ylgruppe	3
6.5	Aminogruppe	1

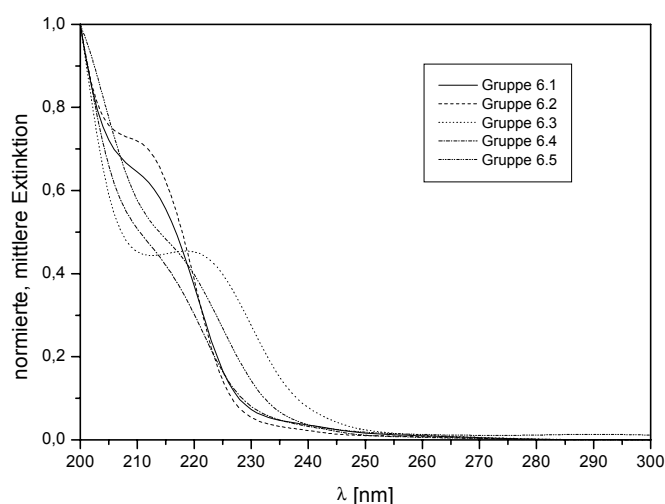


Abb. 56: Gemittelte Gruppenspektren der Gruppen 6.1 bis 6.5.

4.6.10 "Toluolderivate"

Hauptgruppe 7 enthielt 107 Verbindungen mit "Toluol"-Chromophor, dessen Grundstruktur in Abb. 57 wiedergegeben ist.

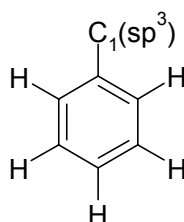


Abb. 57: Gemeinsame Grundstruktur der Verbindungen in Hauptgruppe 7 ("Toluolchromophor").

Für weitere Substituenten am sp^3 -hybridisierten C₁ war als einzige Einschränkung vorgegeben, dass diese keinen eigenständigen Chromophor besitzen durften. Des weiteren wurde auch beispielsweise Phenylacetone ausgeschlossen, da dort über eine mögliche Keto-Enol-Tautomerie der sp^3 -Charakter von C₁ erheblich vermindert gewesen wäre.

Zunächst wurde für die Diskriminanzanalyse innerhalb der Hauptgruppe 7 als relevanter Wellenlängenbereich 200 - 280 nm festgelegt, da lediglich zwei Verbindungen eine (nur geringe)

Absorption oberhalb 280 nm aufwiesen. Die SDA erfolgte dann mit einer Schrittweite von 1 nm. Der Wellenlängenbereich von 230 - 280 nm wurde ebenfalls untersucht, lieferte aber bei der DA schlechtere Ergebnisse.

Die Einteilung der Gruppen wurde zum einen durch Clusteranalyse, zum anderen aufgrund eigener spektroskopischer Erfahrung vorgenommen. Da letzteres Konzept in diesem Fall zu besseren Ergebnissen bei der DA führte, wurde das Ergebnis der Clusteranalyse nicht weiter verfolgt.

Es war schon bei der Erstellung der Spektrenbibliothek aufgefallen, dass sich die Spektren der Verbindungen vom Phenylessigester- bzw. Phenylacetamidtyp deutlich von denen der restlichen Gruppenmitglieder unterschieden. Demzufolge wurden für die Diskriminanzanalyse zwei Gruppen vorgegeben: Gruppe 7.2 (48 Verbindungen) stellten dabei die erwähnten Phenylessigsäurederivate, Gruppe 7.1 (59 Substanzen) wurde von den restlichen Verbindungen gebildet. Abb. 58 zeigt die gemittelten Gruppenspektren in der vollständigen und in der auf die Variablen der DA (210, 214, 217, 225, 234, 247 und 276 nm) beschränkten Darstellung.

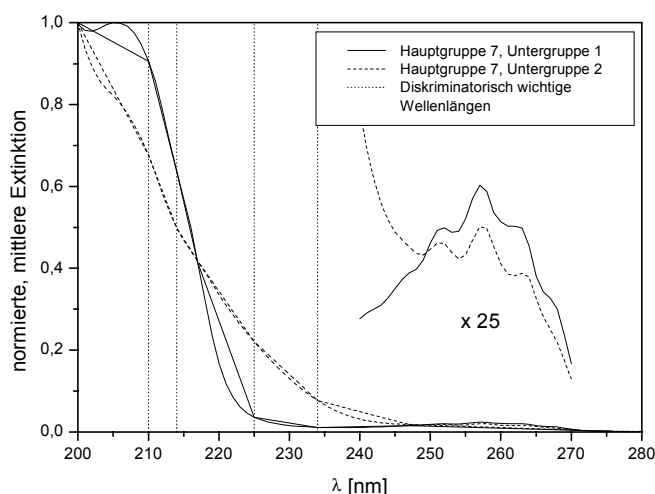


Abb. 58: Gemittelte Spektren der Gruppen 7.1 und 7.2. Die jeweils eckigeren Kurven zeigen das gemittelte Gruppenspektrum, nur durch die in die DA aufgenommenen sieben Variablen dargestellt. Rechts im Bild die um den Faktor 25 vergrößert dargestellte spektrale Feinstruktur, die auch bei den gemittelten Spektren noch gut zu erkennen ist. Die gepunkteten Linien bezeichnen wieder die für die - in diesem Zweigruppenfall einzige - Diskriminanzfunktion diskriminatorisch wichtigsten Variablen.

Da nur zwischen zwei Gruppen zu unterscheiden war, wurde auch nur eine einzige Diskriminanzfunktion ermittelt. Die spektrale Feinstruktur spielte für die Unterscheidung keine Rolle. Erneut ist zu sehen, dass für die Diskriminanzfunktion die Wellenlängen mit dem größten Unterschied zwischen den gemittelten Gruppenspektren ausgewählt wurden.

Tab. 41 zeigt die Güte der Trennung: Lediglich eine der 107 Verbindungen (0,9 %) wurde falsch zugeordnet (der ACE-Hemmer Spirapril, ohne dass eine einfache Erklärung gefunden werden konnte). Die mittlere A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit für die zugeordnete Gruppe lag mit $99,9 \pm 0,8$ % sehr hoch. Für das falsch zugeordnete Spirapril lag sie dagegen bei nur 92,0 %.

Tab. 41: Klassifizierungsergebnisse der DA zwischen den Gruppen 7.1 und 7.2.

Tatsächliche Gruppe	Vorhergesagte Gruppe		
	7.1	7.2	Gesamt
7.1	58 (98,3 %)	1 (1,7 %)	59
7.2	0	48 (100 %)	48

Für die Ermittlung weiterer Untergruppen von Gruppe 7.1 wurden eigene Überlegungen mit den Ergebnissen einer Clusteranalyse kombiniert. Es ergab sich eine Einteilung, die erneut den Schluss nahe legte, dass die Spektren der betrachteten Verbindungen auch durch sterische und andere Wechselwirkungen über größere Strecken im Molekül beeinflusst werden. So enthielt die Gruppe 7.1.3 alle neun Verbindungen aus 7.1, die an irgendeiner Stelle im Molekül eine Imidfunktion aufwiesen. Gruppe 7.1.2 (14 Wirkstoffe) wurde aus Substanzen gebildet, bei denen in nächster Umgebung zum C₁ sperrige Reste wie Cyclohexylringe, Zuckerreste oder Ammoniumgruppen mit langen aliphatischen Ketten zu finden waren. Ob eventuell eine leichte Deformation des Phenylringes für die spektrale Andersartigkeit ursächlich war, kann hier nicht entschieden werden. In Gruppe 7.1.1 wurden die restlichen 36 Verbindungen aus 7.1 zusammengefasst. Tab. 42 zeigt das Klassifizierungsergebnis: 100 % der Verbindungen wurden korrekt klassifiziert.

Tab. 42: Klassifizierungsergebnisse der Gruppen 7.1.1 bis 7.1.3.

Tatsächliche Gruppe		Vorhergesagte Gruppe		
	7.1.1	7.1.2	7.1.3	Gesamt
7.1.1	36 (100 %)	0	0	36
7.1.2	0	14 (100 %)	0	14
7.1.3	0	0	9 (100 %)	9

Die gute Trennung der Gruppen kommt auch in Abb. 59 zum Ausdruck.

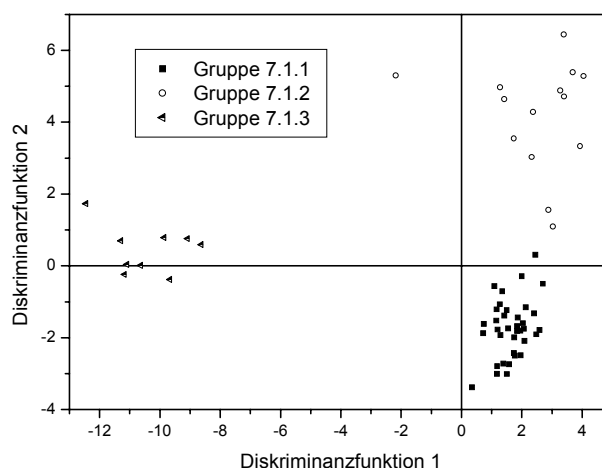


Abb. 59: Auftrennung der Gruppen 7.1.1. bis 7.1.3 im zweidimensionalen Diskriminanzraum.

In der Zusammenschau mit Abb. 60 wird deutlich, dass Y_1 vor allem Gruppe 7.1.3 aufgrund ihrer größeren Absorption im Wellenlängenbereich > 220 nm von den anderen trennt, während Gruppe 7.1.1 durch die geringere Absorption im Bereich um 220 nm charakterisiert wird, was sich in niedrigeren Werten von Y_2 niederschlägt.

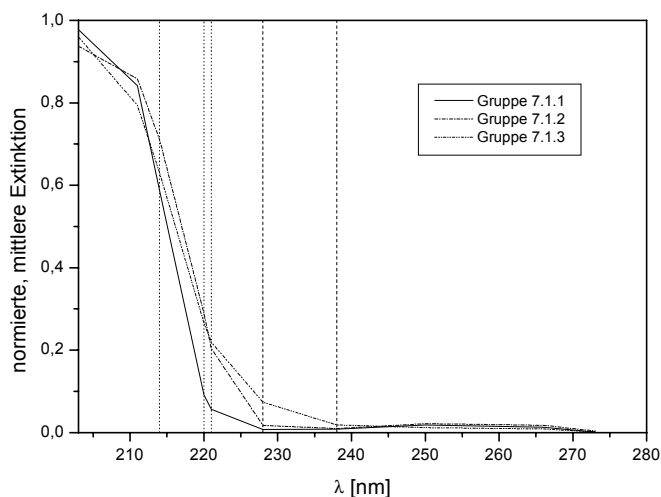


Abb. 60: Darstellung der gemittelten Spektren der Gruppen 7.1.1 bis 7.1.3 auf der Grundlage der in die DA aufgenommenen Variablen. Die gestrichelten senkrechten Linien bezeichnen diskriminatorisch wichtige Variablen für Y_1 , die gepunkteten solche für Y_2 .

Die mittlere A-Posteriori-Wahrscheinlichkeit betrug $99,6 \pm 2,0$ %. Von einer weiteren Ausdifferenzierung der Gruppen wurde angesichts niedriger Substanzzahlen und augenscheinlich bereits sehr ähnlicher Spektren abgesehen.

In der Gruppe 7.2 konnte in einem ersten Schritt zwischen Phenylessigester- (39 Substanzen) und Phenylacetamidverbindungen (Gruppe 7.2.1, neun Wirkstoffe) unterschieden werden. Die korrekte Klassifizierungsquote betrug 100 %. In diesem Fall konnte (aufgrund der Homogenität der Kovarianzmatrizen) auch eine Kreuzvalidierung durchgeführt werden, welche die gleiche Erfolgsquote erbrachte.

Eine weitere Aufspaltung der Gruppe 7.2.1 erschien wegen der zu geringen Substanzzahl fragwürdig. Gleichwohl ließen sich noch zwischen fünf Verbindungen mit zusätzlicher Aminogruppe am C_1 und vier Verbindungen ohne eine solche Gruppe kleinere Spektrenunterschiede feststellen (und per DA auch zu 100 % trennen), auf die an dieser Stelle aber nicht weiter eingegangen werden soll.

Für die Gruppe der Phenylessigester ergaben sich ebenfalls keine eindeutigen Zusammenhänge zur Struktur. Eine Clusteranalyse erbrachte vier Gruppen mit auch optisch klar zu unterscheidenden Spektren (Abb. 61), eine strukturelle Interpretation konnte jedoch nicht gefunden werden.

Allerdings wurde die auch forensisch wichtige Gruppe der Tropinderivate (Tropinsäure, Atropin, Hyoscyamin, Scopolamin) mit Ausnahme des strukturell abweichenden Homatropins sämtlich in Gruppe 7.2.2.1 wiedergefunden. Diese enthielt aber auch andere Verbindungen.

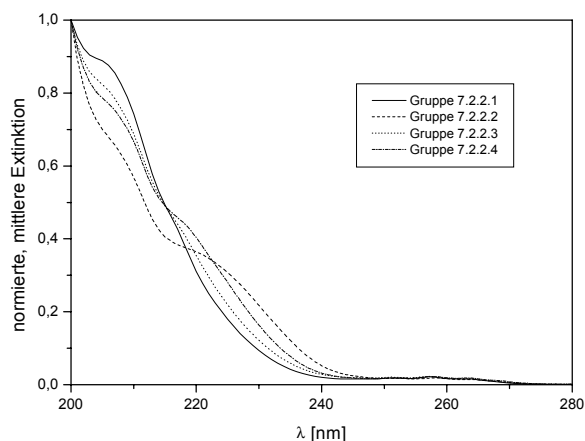


Abb. 61: Gemittelte Spektren der Gruppen 7.2.2.1 bis 7.2.2.4

Die Diskriminanzanalyse trennte zu 100 % (vgl. Abb. 62), bei der Kreuzvalidierung wurde eine Verbindung (das Analgetikum Ethoheptazin) falsch zugeordnet.

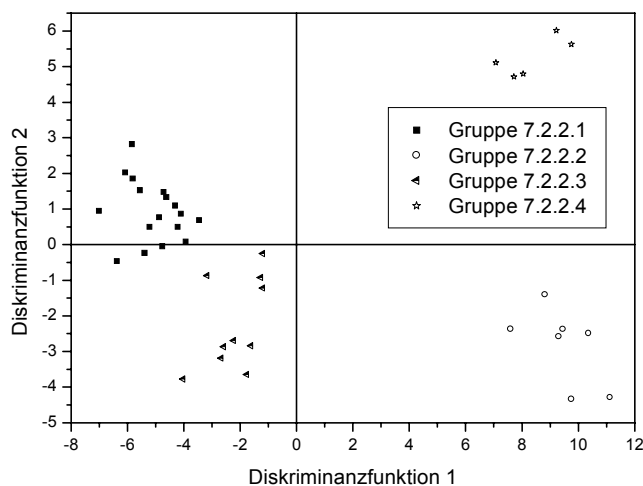


Abb. 62: Darstellung der Gruppen 7.2.2.1 bis 7.2.2.4 in der Ebene der ersten 2 (von 3) Diskriminanzfunktionen.

4.6.11 Steroide vom "Mesityloxidtyp"

In dieser Hauptgruppe wurden keine weiteren sinnvollen Untergruppen gefunden.

4.6.12 Steroide vom "Cyclohexadienontyp"

Die DA wurde im Bereich von 200 - 300 nm mit einer Schrittweite von 1 nm durchgeführt. Zwischen den Spektren und dem Substitutionsmuster ergab sich ein eindeutiger Zusammenhang, so dass insgesamt vier Gruppen gebildet werden konnten (Abb. 63, folgende Seite).

Die untersuchten 57 Verbindungen wurden zu 100 % richtig zugeordnet. Die ersten beiden Diskriminanzfunktionen erklärten 98,9 % der Gesamtvarianz, was auch durch Abb. 64 unterstrichen wird.

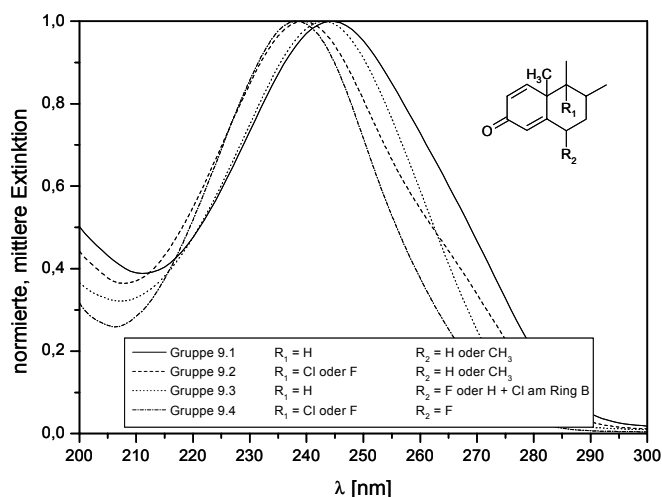


Abb. 63: Gemittelte Spektren der Gruppen 9.1 bis 9.4

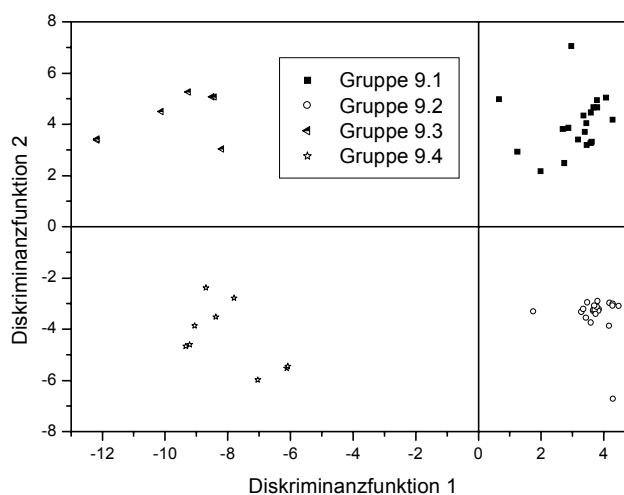


Abb. 64: Auftragung der Gruppen 9.1 bis 9.4 in der Ebene der ersten beiden Diskriminanzfunktionen.

Die Frage, warum sich der Einfluss der nicht direkt mit dem Chromophor verbundenen Substituenten so unerwartet stark auf das Spektrum auswirkt, bleibt ungeklärt. Ein Zusammenhang mit der tatsächlichen räumlichen Struktur des Moleküls wurde als wahrscheinlich angenommen, konnte aber mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht untersucht werden. Eine weitergehende Aufspaltung der vier gefundenen Gruppen wurde als nicht sinnvoll erachtet.

4.6.13 Herzglykoside

Bei der Hauptgruppe 10 ließen sich zwei Untergruppen unterscheiden: die Gruppe 10.2 mit acylierter OH-Gruppe am Ring D des Steroidgerüsts (3 Wirkstoffe) und die Gruppe 10.1 mit nicht acylierter OH-Gruppe (20 Substanzen).

Diese beiden Gruppen wurden im Wellenlängenbereich von 200 - 260 nm zu 100 % korrekt klassifiziert. Interessanterweise reichte dafür eine einzige ausgewählte Variable aus.

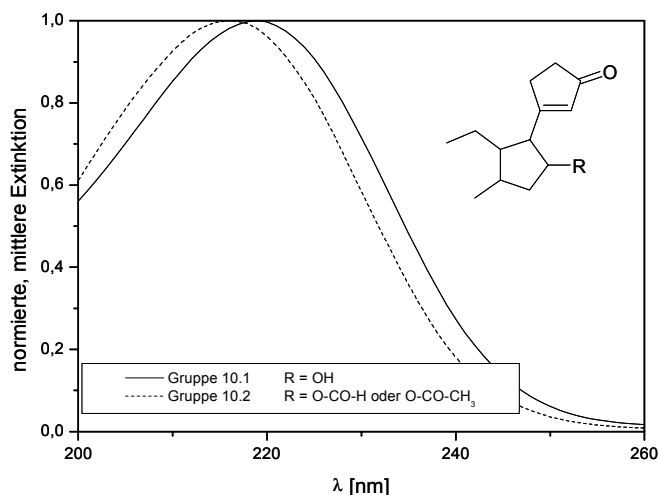


Abb. 65: Gemittelte Gruppenspektren der Gruppen 10.1 und 10.2.

4.6.14 Zusammenfassende Diskussion der Klassifizierung

Insgesamt zeigen die in den vorigen Abschnitten vorgestellten Ergebnisse, dass die Anwendung der (schrittweisen) Diskriminanzanalyse auf die UV-Spektren toxikologisch relevanter Substanzen auf unkomplizierte Art und Weise mit herkömmlicher Standardstatistiksoftware durchgeführt werden kann und sinnvolle, nachvollziehbare Ergebnisse liefert. Die sehr weitgehende Unterscheidbarkeit organischer Wirkstoffe anhand ihrer UV-Spektren wurde insgesamt durch die vorgestellten Ergebnisse ausführlich belegt. Das Hauptziel der Untersuchungen, nämlich ein hohes Maß an Spezifität der UV-Spektren für einen größeren Substanzkreis nachzuweisen, wurde somit erreicht. Teilweise konnte eine weitere Unterteilung der festgelegten Hauptgruppen bis zur vierten Hierarchieebene vorgenommen werden. Aufgrund der vergleichsweise großen Anzahl von fast 500 untersuchten Substanzen aus 10 Gruppen darf angenommen werden, dass diese Ergebnisse als repräsentativ für den gesamten Substanzbestand der Spektrenbibliothek gelten können.

Die Aussagefähigkeit der Aufspaltung lässt wegen der geringeren Substanzzahlen naturgemäß auf den unteren Hierarchieebenen nach, die zugehörigen Diskriminanzfunktionen sind sicherlich mit der gebotenen Vorsicht zu betrachten bzw. wurden in der vorliegenden Arbeit auch gar nicht mehr mit angegeben. Umgekehrt ist dieser Sachverhalt aber auch gerade als Beweis für ein hohes Maß an Spezifität zu werten: unter fast 500 toxikologisch besonders wichtigen Substanzen wurden keine größeren Untergruppen von Substanzen gefunden, die nicht noch deutliche spektrale Unterschiede aufgewiesen hätten.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Unterschiede zwischen den Substanzgruppen vor allem anhand des Vergleichs der gemittelten Gruppenspektren verdeutlicht. Diese Darstellung eignete sich besonders deshalb, weil die tatsächliche Vorgehensweise der Diskriminanzanalyse auf diese Weise z. T. nachvollzogen wurde. Die Auswahl der durch den Computer in die Diskriminanzanalyse einbezogenen Variablen entsprach zumeist derjenigen, die auch ein menschlicher Betrachter anhand der gemittelten Gruppenspektren vermutlich getroffen hätte. Gleichzeitig sind dieser Darstellung aber auch Grenzen gesetzt, insbesondere deshalb, weil die z. T. erheblichen Abweichungen einzelner Spektren vom Gruppenmittel nicht erkennbar sind.

Es soll an dieser Stelle noch einmal betont werden, dass die Diskriminanzanalyse nicht darüber entscheiden kann, ob die festgelegten Gruppen inhaltlich sinnvoll sind; sie kann lediglich herausfinden, ob sich Diskriminanzfunktionen finden lassen, mit denen effektiv zwischen den Gruppen unterschieden werden kann. An mehreren Beispielen sowohl bei den Haupt- als auch bei den Untergruppen zeigte sich, dass weder ein rein überwachtes Vorgehen (z. B. Zusammenstellung der Gruppen durch Zusammenfassen der visuell ähnlichsten Spektren) noch ein rein unüberwachtes (durch Clusteranalyse auf der Basis des Similarity Index) im Hinblick auf eine erfolgreiche Trennung mittels Diskriminanzanalyse ein optimales Ergebnis bei der Gruppeneinteilung lieferte. Es wurde in der vorliegenden Arbeit daher i. d. R. ein gemischtes Vorgehen gewählt, um möglichst hohe korrekte Klassifizierungsquoten zu erzielen.

Selbstverständlich besteht zwischen der pharmakologischen Wirkung eines Stoffes und seinem UV-Spektrum weder in die eine noch in die andere Richtung ein direkter ursächlicher Zusammenhang. Trotzdem zeichnen sich aber einige wichtige Wirkstoffgruppen mit vergleichsweise einheitlichem Wirkspektrum gleichzeitig durch große strukturelle Einheitlichkeit aus. Für die Systematische Toxikologische Analyse wäre dann die Frage von Interesse, inwiefern über die jeweiligen UV-Spektren indirekt eventuell auch ein Rückschluss auf die pharmakologische Wirkung möglich wäre. Bei der Einteilung der Hauptgruppen (die primär nach strukturellen Gesichtspunkten erfolgte) wurde dem Rechnung getragen, indem sowohl ihrer Wirkung nach heterogene als auch sehr homogene Gruppen untersucht wurden. Insbesondere die Spektren von Benzodiazepinen (Tranquilizer, Gruppe 2), Phenothiazinen (Neuroleptika, Gruppe 3), Barbituraten (Hypnotika, Gruppe 6) und der Steroide (hormonartige Wirkung, Gruppen 8-9) wiesen dabei besonders charakteristische spektrale Eigenheiten auf, was auch durch die gute Unterscheidbarkeit der Hauptgruppen unterstrichen wurde.

Es ist anzunehmen, dass unbekannte, nicht in der Spektrenbibliothek enthaltene Vertreter dieser Wirkstoffgruppen in einer realen Messung zweifelsfrei zugeordnet werden könnten. In Verbindung mit zusätzlichen Informationen über die beim mit Vergiftungsverdacht aufgenommenen Patienten beobachteten Symptome könnten so auch für nicht in der Spektrenbibliothek enthaltene Wirkstoffe wertvolle Zusatzinformationen gewonnen werden.

Wie bereits erwähnt, bestand das Hauptziel der vorgestellten Untersuchungen darin, den in den UV-Spektren enthaltenen hohen Grad an spezifischer Strukturinformation zu belegen. Für die Bewertung der Diskriminanzanalyse im Hinblick auf ihre Tauglichkeit für den tatsächlichen Einsatz zur Klassifizierung unbekannter Substanzen wären sicherlich breiter angelegte Untersuchungen an Realproben vonnöten. Die gefundenen Diskriminanzfunktionen bilden hierfür eine erste Basis, die durch Hinzunahme neu gefundener (und sicher identifizierter) Verbindungen jederzeit schrittweise ausgebaut werden kann.

Für die angesprochenen Substanzgruppen mit ausgeprägt einheitlicher chemischer Struktur ist die Zuordnung dabei auch schon ohne Diskriminanzanalyse durch einfache Bibliothekssuche möglich: bei hinreichender spektraler Ähnlichkeit der besten Kandidaten auf der Ergebnisliste (vgl. Abb. 9, S. 25) läge die Vermutung nahe, dass die betreffende unbekannte Substanz zur selben Wirkstoffgruppe gehört. Zwischen feineren Strukturunterschieden, wie sie in der vorliegenden Arbeit z. B. die Mitglieder der Trizyklen (Hauptgruppe 1) kennzeichneten, könnte

bei diesem Vorgehen jedoch nicht mehr differenziert werden. Die Diskriminanzanalyse besitzt darüber hinaus den Vorteil, dass das Modell (allenfalls abhängig von der zur Verfügung stehenden Rechenleistung) im Prinzip um beliebig viele weitere Substanzgruppen erweitert werden kann. Insbesondere bestünde auch die Möglichkeit, aus mehreren einzelnen Chromophoren zusammengesetzte Absorptionssysteme miteinzubeziehen. Ab einer gewissen Größenordnung dürfte dann der Weg über die Bibliothekssuche zu unübersichtlich werden. Darüber hinaus besteht bei einem umfassenden Klassifizierungssystem auch die Möglichkeit einer Abgrenzung zu anderen Teilgruppen aufgrund der berechneten Wahrscheinlichkeiten für die Gruppenzugehörigkeit.

Als Hauptfehlerquelle der Methode ist bei sehr ähnlichen Spektren die Überbewertung kleinster Unterschiede bis hin zu spektralem Rauschen zu sehen. Hier ist zu fordern, dass neben der Gruppenzuordnung ausschließlich auf der Basis der Diskriminanzwerte stets auch eine visuelle Überlagerung mit den Spektren der in Frage kommenden Gruppen durchgeführt werden sollte. Ein Indiz für den wirklichen Grad an Unterscheidbarkeit zwischen den Gruppen könnte die Anzahl der in die Diskriminanzanalyse aufgenommenen Variablen sein: bei sehr ähnlichen Gruppenspektren werden einzelne Variablen (Wellenlängen) nur einen geringeren Anteil der Varianz erklären können, demzufolge würden hier mehr Variablen benötigt als bei stärker unterschiedlichen. Gleichzeitig spielt hierbei allerdings die Zahl der zu unterscheidenden Gruppen eine Rolle, da bei einer größeren Gruppenzahl naturgemäß mehr Variablen für die vollständige gegenseitige Unterscheidbarkeit benötigt würden.

Insgesamt sollte das Verfahren nur im Bewusstsein seiner Anfälligkeit für subjektive Wertungen durchgeführt werden. Für die Substanzidentifizierung im Rahmen der STA, gerade in Grenzbereichen, besteht dieses Problem allerdings ohnehin (z. B. bei der Festlegung des Schwellenwertes für den SI oder bei der in Abschnitt 2.1.3 angesprochenen abschließenden Plausibilitätsbetrachtung aller STA-Analysenergebnisse) und ist prinzipiell auch nicht auflösbar. Auch wenn der Reiz eines Klassifizierungsverfahrens gerade in der vollständigen Computerisierung liegt, muss auch hier von einer unkritischen, vollautomatisierten Vorgehensweise dringend abgeraten werden.

Auch wenn für eine tatsächliche praktische Anwendbarkeit des vorgestellten Verfahrens zur Klassifizierung unbekannter Substanzen sicherlich noch einiges an Vorarbeiten zu leisten wäre, legen die erzielten Ergebnisse den Schluss nahe, dass damit ein zusätzliches (sicherlich keinesfalls für sich alleine genommen hinreichendes) Identifikationskriterium für die STA zur Verfügung stünde. Gerade zur Identifizierung vermuteter und aus der Literatur bekannter Metabolite, oder auch von Substanzen, deren Vorhandensein aufgrund der Fallgeschichte vermutet wird, die aber nicht als Referenzsubstanz vorliegen, könnte dieses Werkzeug einen wichtigen Beitrag leisten.

4.7 Genauigkeit bei der Quantifizierung

4.7.1 Anforderungen an die Genauigkeit der Quantifizierung

Bei der Aufklärung einer Vergiftung spielt neben der korrekten Substanzidentifizierung auch die aufgenommene Substanzmenge eine zentrale Rolle, insbesondere wenn nachfolgende Thera-

pieentscheidungen direkt von den gefundenen Analysenergebnissen abhängig gemacht werden.

Die Beantwortung der Frage, wie genau eine Quantifizierung im Rahmen der STA zu erfolgen hat, stellt im wesentlichen eine Abwägung zwischen dem zu betreibenden Aufwand und dem resultierenden Nutzen dar. Während für den erstgenannten Gesichtspunkt sowohl die technische Machbarkeit, als auch der Kosten- und Zeitaufwand im Mittelpunkt der Überlegungen stehen, ist für den zu erwartenden Nutzen vor allem zu diskutieren, wie eng eine gemessene (Blut-)Konzentration mit der Stärke der eingetretenen Wirkung tatsächlich korreliert.

Die Entscheidung über die zur Verfügung stehende Analysenzeit und/oder über eine eventuelle obere Kostengrenze trifft i. d. R. der Auftraggeber der Analyse, es ist dann im Rahmen einer Methodenvvalidierung lediglich zu prüfen, inwieweit die Forderungen eingehalten werden können. Eine Abschätzung der technischen Möglichkeiten, also vor allem von Einflüssen auf die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung bei der Probenvorbereitung und der eigentlichen Durchführung der Analyse, erfolgt in den nachfolgenden Abschnitten.

Die Probleme bei der Diskussion der Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung können dagegen hier nur angesprochen werden, sie entziehen sich einer pauschalen Quantifizierung. Den in diesem Zusammenhang wahrscheinlich wichtigsten Einflussfaktor stellt die laut Müller [9] oftmals unterschätzte biologische Variabilität dar. Hierunter werden verschiedene interindividuelle Abweichungen von der "Norm" verstanden, welche die Kinetik der Resorption von Fremdstoffen (z. B. bei Erkrankungen des Verdauungstraktes), den eigentlichen Metabolismus (z. B. aufgrund genetisch bedingt unterschiedlicher Enzymausstattung), die Dosis-Wirkungs-Beziehung (z. B. im Falle von Toleranzentwicklung) aber auch Unterschiede hinsichtlich anderer prädisponierender Faktoren, wie Alter, Geschlecht, körperlicher Zustand etc. betreffen können. Resorption und Metabolismus können darüber hinaus im Einzelfall durch die eingenommene Substanz noch zusätzlich beeinflusst werden, auch die Wechselwirkung mit anderen Wirkstoffen muss berücksichtigt werden.

Das Ausmaß des Einflusses dieser Faktoren zusammengekommen lässt sich nur schwer beziffern. Im Rahmen der toxikologischen Stoffbewertung zur Abschätzung von noch nicht gesundheitsschädlichen Aufnahmemengen potentiell gefährlicher Substanzen wird häufig ein Sicherheitsfaktor von 10 für die interindividuelle Variabilität veranschlagt (also ein zehnfacher Unterschied in der Wirkstärke zwischen dem empfindlichsten und dem unempfindlichsten Individuum einer Population).

Der zweite bedeutende Gesichtspunkt betrifft die Probennahme und das "Probenhandling". Als wichtige Einflussgrößen sind hier der zeitliche Abstand zwischen der Substanzaufnahme und der Gewinnung der Probe, der Ort der Probennahme (venöses oder arterielles Blut) sowie die Stabilität des Wirkstoffes unter den Lagerungs- und Transportbedingungen zu nennen. Des weiteren wird i. d. R. nicht die vollständige Probe für die Analyse eingesetzt, so dass u. U. die Inhomogenität einer Probe bei der Abnahme eines Aliquots das Messergebnis verfälschen kann.

Aus den vorstehend aufgeführten Überlegungen könnte der Schluss gezogen werden, dass generell die Einschätzung des Schweregrades einer Vergiftung auf der Basis einer gemessenen Blutkonzentration nicht oder nur sehr ungenau möglich ist. Der in der Praxis beschrittene

Ausweg, bei dem die beschriebenen Einflussfaktoren implizit mitberücksichtigt werden, besteht in der Auswertung einer großen Zahl in der Literatur publizierter Kasuistiken. Hierzu sind Bücher bzw. Übersichtsartikel u. a. von Baselt [220], Regenthal et al. [206] und Schulz und Schmoldt [207] erschienen, in denen empirisch gefundene Plasmakonzentrationen als Referenzwerte gesammelt wurden. Dabei wurden anhand der bei den Patienten aufgetretenen Symptomatik drei Bereiche unterschieden: der "therapeutische" und damit toxikologisch unbedenkliche Dosisbereich, der "toxische" Bereich mit bereits erheblichen Vergiftungsanzeichen und schließlich der "komatös-letale" Bereich.

Aus der Tatsache, dass in diesen Listen der therapeutische Bereich für einige der aufgeführten Wirkstoffe z. T. zwei Größenordnungen der Konzentration überstreicht (sicher aber nicht die verabreichte Dosierung) wird erneut das Ausmaß der mit diesem Vorgehen verbundenen Unsicherheit deutlich (für den toxischen und den komatös-letalen Bereich werden ohnehin nur Untergrenzen angegeben). Selbstverständlich erfolgt immer ein Abgleich der Einschätzung mit der tatsächlichen Schwere der Symptome beim Patienten, bei komplizierteren Vergiftungsverläufen können diese, für sich alleine genommen, allerdings auch für eine trügerische Sicherheit sorgen.

4.7.2 Pipettiergenauigkeit

Im Rahmen der Probenaufarbeitung tragen zwei Faktoren zum Fehler der Quantifizierung bei. Zum einen können – substanzunabhängig – Pipettierfehler die Volumenverhältnisse verfälschen. Wird die Probenkonzentration über das Verfahren der Standardaddition ermittelt (s. Abschnitt 3.1.6), so kommt noch der Wägefehler beim Ansetzen der Standardlösung hinzu. Zum anderen, und vermutlich sehr viel wichtiger, beeinflusst bei den Extraktionsverfahren die substanzabhängige Wiederfindungsrate das quantitative Messergebnis.

Zur Kontrolle der Pipettierfehler wurde eine Testreihe mit vier Personen mit unterschiedlicher Laborerfahrung (eine Studentin, zwei Doktoranden und eine MTA) durchgeführt, die mit einer variablen Eppendorf-Pipette (10 – 100 µl) jeweils 15mal 20 µl Wasser in ein Gefäß auf einer Laborwaage pipettieren sollten (die angegebene Messgenauigkeit der Waage von 0,01 mg wurde hier vernachlässigt). Aufgrund der Dichte von Wasser ($\rho = 0,997 \text{ g ml}^{-1}$ bei 25 °C) lag der Erwartungswert bei 19,94 mg. Die Ergebnisse werden in Tab. 43 wiedergegeben.

Tab. 43: Statistische Kenndaten der Pipettierversuche (mehrmaliges Pipettieren von 20 µl Wasser in ein Gefäß auf der Laborwaage). Die Laborerfahrung der beteiligten Personen nahm in der Reihenfolge der Nummerierung zu.

Person	N	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient
1	15	19,59	0,28	1,4 %
2	15	19,78	0,24	1,2 %
3	15	19,85	0,23	1,1 %
4	15	19,92	0,12	0,6 %

Insgesamt liegen die Resultate sehr nahe beieinander. Deutlich zu sehen ist der Einfluss der Laborerfahrung auf das Ergebnis: insbesondere Person 4 (MTA) zeichnete sich durch ein

Ergebnis nahe am Erwartungswert mit einem niedrigen VK $< 1\%$ aus. Lässt man das Ergebnis für die unerfahrenste Person weg, so kann für geübtes Laborpersonal eine Pipettierpräzision von etwa 1% angesetzt werden.

Interessanterweise nahm auch die Ergebnisrichtigkeit mit größerer Laborerfahrung zu. Für die Abweichung vom Erwartungswert wurde ein Sollwert-t-Test durchgeführt (s. [157], S. 89). Im 99% - Vertrauensbereich wich nur das Ergebnis von Person 1 signifikant vom Erwartungswert ab, das Ergebnis von Person 2 lag knapp außerhalb des 95% - Vertrauensintervalls. Aufgrund der beim verwendeten Pipettentyp gegebenen Möglichkeit zur Nachjustierung sollten in der Praxis die gefundenen systematischen Abweichungen allerdings mühelos zu korrigieren sein.

Die gefundenen Ergebnisse befinden sich auch im Einklang mit den Herstellerangaben zu Präzision und Richtigkeit (s. Tab. 4, S. 53). Da der Fehler mit zunehmendem Pipettivolumen eher noch abnehmen sollte, erschien es insgesamt gerechtfertigt, für die weiteren Berechnungen einen VK von 1% anzusetzen.

4.7.3 Wiederfindung

Die Ausbeute bei der Extraktion hängt für ein gegebenes System aus organischer und wässriger Phase zum einen vom Verhältnis der beiden Phasenvolumina und zum anderen vom Nernstschen Verteilungskoeffizienten der betrachteten Substanz und damit primär von ihrer Hydro- bzw. Lipophilie ab. Diese variiert pH-abhängig für einen gegebenen Stoff dann erheblich, wenn protonierbare oder im Gegenteil deprotonierbare Gruppen vorliegen, so dass sich eine pH-Änderung in einer Änderung des Ionisierungsgrades niederschlägt. Aus diesem Grund werden im Routineeinsatz der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen HPLC-DAD-Methode immer ein saurer und ein basischer Probenextrakt angefertigt (vgl. Abschnitte 3.1.3 und 3.1.5).

Die Tatsache, dass viele Wirkstoffe, z. T. in erheblicher Menge, reversibel an im Blut vorhandene Proteine (vor allem an Albumin, aber auch an Glyko- und Lipoproteine) gebunden vorliegen, hat dagegen auf das Extraktionsergebnis keinen bedeutenden Einfluss: wird dem Blut eine bestimmte Wirkstoffmenge durch die Extraktion entzogen, wird durch die Freisetzung einer entsprechenden Menge gebundenen Wirkstoffes aus der Bindung das Gleichgewicht schnell wieder nachgestellt. Zudem bewirkt der Kontakt des Serums mit der organischen Phase auch bei der Extraktion eine Proteinfällung, so dass eventuell noch gebundene Substanz auf diesem Wege freigesetzt werden sollte.

Es ist bekannt, dass individuelle Probeneigenheiten wie Fettgehalt oder die Belastung mit Fäulnisprodukten (bei nicht sachgerechter Lagerung oder bei Leichenproben) zu schwankenden Wiederfindungsraten führen. In der Konsequenz kann die Ausbeutebestimmung für eine gegebene Substanz nur für eine konkrete Probe mit hoher Genauigkeit durchgeführt werden (Quantifizierung über das Standardadditionsverfahren), eine Ermittlung von allgemeingültigen Referenzwerten müsste entweder an einer großen Zahl verschiedener Blutproben erfolgen oder aber der zugehörige Fehler müsste entsprechend groß angesetzt werden.

Tab. 44 zeigt die mittels der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Flüssig-Flüssig-Extraktion

mit Dichlormethan experimentell in Doppelbestimmung ermittelten Wiederfindungsraten für über 80 toxikologisch relevante Verbindungen. Hierfür wurde unbelastetes Serum durch Dotieren mit Standardlösungen der betreffenden Substanz auf eine Wirkstoffkonzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ eingestellt. Der jeweils zu erwartende theoretische 100-%-Wert wurde über die separat vermessene, zum Dotieren verwendete Lösung errechnet. Der mit dieser Vorgehensweise verbundene Fehler bei der Richtigkeit wurde vernachlässigt, da nicht so sehr die absolute Richtigkeit des Ergebnisses als vielmehr die zu erwartenden Schwankungen von Messung zu Messung beobachtet werden sollten.

Tab. 44: Erzielte Wiederfindungsraten für 84 häufig bei Vergiftungen vorkommende Verbindungen. Methode b: Extraktion mit Dichlormethan und TRIS-Puffer pH 9,0, Methode s: Extraktion mit Dichlormethan und 0,1 N HCl. Die Wiederfindung (WF) wurde als Mittelwert der Ergebnisse von Doppelbestimmungen bei einer Serumkonzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (gespiketes Leerserum) ermittelt. In der Tabelle angegeben ist jeweils das Ergebnis für die erfolgreichere Methode. Der VK_{WF} wurde aus dem Quotienten der Abweichung der Einzelbestimmungen und des Mittelwertes gebildet.

Substanz	Methode	WF / %	VK_{WF} / %	Substanz	Methode	WF / %	VK_{WF} / %
Amitriptylin	b	75	25	Haloperidol	b	78	9
Atenolol	b	14	7	Ibuprofen	s	50	12
Carbamazepin	s	70	14	Imipramin	b	82	11
Carbromal	b	98	2	Indomethacin	s	82	4
Chinidin	b	80	11	Levomepromazin	b	73	3
Chloroquin	b	94	6	Lidocain	b	83	9
Chlorprothixen	b	25	44	Lorazepam	b	99	2
Clobazam	b	74	13	Lormetazepam	b	85	17
Clomethiazol	b	45	11	Maprotilin	b	83	16
Clomipramin	b	82	11	MDA	b	96	4
Clonazepam	b	73	16	MDE	b	90	11
Cocain	b	58	22	MDMA	b	98	3
Coffein	s	85	6	Metamizol	s	98	3
Desipramin	b	95	5	Methadon	b	88	9
Dextromethorphan	b	80	4	Methaqualon	b	100	0
Dextropropoxyphen	b	55	11	Methohexital	s	69	1
Diazepam	b	80	13	Metoprolol	b	95	3
Diclofenac	s	38	20	Mexiletin	b	64	10
Diphenhydramin	b	62	11	Midazolam	b	85	6
Disopyramid	b	98	3	Nifedipin	b	91	4
Doxepin	b	82	7	Nitrazepam	b	62	6
Doxylamin	b	66	8	Nortriptylin	b	75	7
Ethosuximid	s	68	4	Opipramol	b	89	10
Fentanyl	b	65	8	Oxcarbazepin	s	65	23
Flecainid	b	76	9	Oxprenolol	b	92	6
Flunitrazepam	b	98	3	Paroxetin	b	48	5
Fluoxetin	b	78	19	Pentazocin	b	92	8
Glutethimid	s	78	-1	Pentobarbital	s	54	23

Fortsetzung Tab. 44

Substanz	Methode	WF / %	VK _{WF} / %	Substanz	Methode	WF / %	VK _{WF} / %
Perazin	b	93	3	Sertralin	b	85	11
Phenazon	b	75	8	Sildenafil	b	90	11
Phencyclidin	b	50	15	Sotalol	b	15	0
Phenobarbital	s	55	9	Talinolol	b	44	2
Phenprocoumon	s	33	23	Thiopental	s	78	4
Phenytoin	s	93	8	Thioridazin	b	73	7
Pipamperon	b	65	0	Tilidin	b	40	0
Primidon	s	24	6	Tramadol	b	54	12
Procainamid	b	25	2	Trimipramin	b	75	0
Promethazin	b	75	8	Venlafaxin	b	82	11
Propafenon	b	73	18	Verapamil	b	35	14
Propranolol	b	98	3	Warfarin	b	18	14
Risperidon	b	89	2	Zolpidem	b	84	11
Sertindol	b	76	13	Zopiclon	b	53	0

Es ist deutlich zu erkennen und nicht überraschend, dass die absoluten Wiederfindungsraten substanzabhängig stark unterschiedlich ausfielen (sie lagen zwischen 14 % für Atenolol und 100 % für Methaqualon), die Angabe eines Mittelwertes über alle Substanzen wäre unsinnig. Auch unter Berücksichtigung der im statistischen Sinne begrenzten Aussagekraft von Doppelbestimmungen bleibt dagegen unklar, wieso die VK für einige Substanzen sehr viel höher lagen als für andere (und zwar unabhängig vom Absolutwert der WF).

Zu beachten ist, dass in den angegebenen Schwankungen sowohl der im vorigen Abschnitt behandelte Pipettierfehler als auch der nachfolgend untersuchte Fehler der Peakflächen mit enthalten sind. Zieht man beide von den in Tab. 44 angegebenen VK ab, so kommt man im Rahmen einer ganz groben Schätzung auf einen mittleren VK_{WF} von etwa 10 %. In Ermangelung einer besseren Bestimmungsmethode wurde dieser Wert für die weiteren Berechnungen (s. Abschnitt 4.7.5) verwendet.

4.7.4 Peakflächen

Wie bereits erwähnt, enthielt die zur Qualitätskontrolle eingesetzte Standardlösung auch den Wirkstoff Coffein (vgl. Abschnitt 3.2.3) zur Überprüfung der Peakflächen. Analog zu den in Abschnitt 4.4.2 vorgestellten Ergebnissen für die absolute Retentionszeit (s. dort Tab. 11 und Tab. 12) konnten auf diese Weise sowohl Langzeitmessungen für die laborinterne Vergleichspräzision als auch eine Bestimmung der tagesaktuellen Wiederholpräzision der Peakflächen ermittelt werden.

Für die Langzeitmessung über einen Zeitraum von 31 Monaten (September 1998 – März 2001, Anzahl der Messungen $n = 239$) wurde für die eingesetzte Coffeinkonzentration ein Wert von $(2,212 \pm 0,168) \times 10^6$ Flächeneinheiten (Shimadzu-HPLC-Software, Messung bei 225 nm) be-

stimmt, dies entspricht einem VK von 7,6 %. Hierbei ist zu bemerken, dass die Werte aufgrund von geringen Verdunstungseffekten (über den gesamten Zeitraum wurde dieselbe Stammlösung verwendet) eine leichte Drift aufwiesen, so dass der VK eher zu hoch bestimmt wurde.

Für die Wiederholpräzision ($n = 15$) wurde neben der Peakfläche von Coffein auch diejenige von MPPH ausgewertet. Für beide ergab sich gleichermaßen ein VK von 0,6 %, dies wurde als Bestätigung für die Annahme gewertet, dass bei einer Messung aus reiner Lösung die Schwankungen der Peakfläche substanzunabhängig waren.

Aus den beschriebenen Ergebnissen wurden für die weiteren Berechnungen eine laborinterne Vergleichspräzision von 8 % und eine Wiederholpräzision von 1 % abgeleitet.

Welcher der beiden Werte in der Praxis einzusetzen ist, hängt von der gewählten Quantifizierungsmethode ab. Wird lediglich auf der Basis der bei der Bibliotheksmessung ermittelten Peakfläche quantifiziert, ist die laborinterne Vergleichspräzision zu wählen, wird die Substanzkonzentration über die Zusatzmethode errechnet und somit auf einen in unmittelbarer zeitlicher Nähe gemessenen Referenzwert bezogen, kann dagegen die niedrigere Wiederholpräzision verwendet werden.

Bei diesen Betrachtungen konnte die Konzentrationsabhängigkeit der Peakflächenpräzision nicht berücksichtigt werden, denn vergleichbare Langzeitmessungen für niedrige Substanzkonzentrationen in der Nähe der Bestimmungsgrenze lagen nicht vor. In diesem Bereich dürfte die Streuung der Werte allerdings um einiges höher liegen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen im Einklang mit in der Literatur publizierten Daten. Chen et al. [219] verglichen die Wiederholpräzision der Peakflächen für UV- und MS-Detektion. Während im ersteren Fall (Variable-Wavelength-Detektor) VK bis zu 4 % gefunden wurden, wurden bei der LC-MS (APCI) Werte bis zu 31 % erhalten.

Bocchi et al. [221] fanden, ebenfalls mit einem Variable-Wavelength-Detektor, Wiederholpräzisionen zwischen 1,2 und 3,1 % bei vierfacher Injektion von 500 ng (absolut) für verschiedene phenolische und Zimtsäuren.

Koves und Wells [22] bestimmten an einem DAD für zehn verschiedene Wirkstoffe bei je einer niedrigen (zwischen 50 und 420 ng ml⁻¹) und einer hohen (ca. 0,8 - 4,5 µg ml⁻¹) Konzentration die Wiederholpräzision (niedrige Konz.: VK = 2 - 5 %, hohe Konz.: 0,7 - 4 %) sowie die laborinterne Vergleichspräzision (niedrig: VK = 2 - 9 %, hoch: 2 - 7 %).

Veröffentlichungen, in denen von Langzeitmessungen über einen mit den hier vorgestellten Ergebnissen vergleichbar langen Zeitraum berichtet wurde, wurden nicht gefunden.

4.7.5 Fehler bei den verschiedenen Aufarbeitungen

Nach der Einschätzung einzelner potenzieller Fehlerquellen in den vorangegangenen Abschnitten sollte nun ihr Einfluss auf die Konzentrationsbestimmung untersucht werden.

Die Formel zur Berechnung der Blutkonzentration aus der gemessenen Peakfläche A_i hängt von

der eingesetzten Probenaufarbeitung (Extraktion oder Fällung) und vom Bezugspunkt der Quantifizierung (Referenzfläche aus der Spektrenbibliothek oder Standardadditionsverfahren, s. Abschnitt 3.1.6) ab. Sie lautet für die Extraktion mit Dichlormethan und die anschließende Quantifizierung über die Referenzfläche aus der Spektrenbibliothek:

$$c_i = \frac{A_i \times V_e \times V_w \times 1.000 \mu\text{l} / \text{ml}}{A_{1\mu\text{g}} \times V_{\text{inj}} \times (WF / 100 \%) \times V_a \times V_i} \quad (39)$$

mit V_i = eingesetztes Probenvolumen (meist 500 μl Blut), V_e = Volumen des zugesetzten Extraktionsmittels (meist 400 μl Dichlormethan), V_a = Volumen an organischer Phase, das nach erfolgter Extraktion für die weitere Verarbeitung (Abdampfen im Stickstoffstrom) abgenommen wurde (meist 200 μl), V_w = Volumen an mobiler Phase, in welchem der zur Trockne eingedampfte Extrakt wieder aufgenommen wurde (i. d. R. 100 μl), V_{inj} = injiziertes Volumen, A_i = gemessene Peakfläche (angegeben in "area units", $A_{1\mu\text{g}}$ = in der Spektrenbibliothek gespeicherte Referenzfläche für 1 μg Substanz bei $225 \pm 5 \text{ nm}$ (angegeben in area units / μg), WF = Wiederfindung (geteilt durch 100 %). Der Umrechnungsfaktor von 1.000 $\mu\text{l}/\text{ml}$ erklärt sich dadurch, dass c_i in $\mu\text{g}/\text{ml}$ angegeben wird, während sämtliche anderen Volumina mit der Dimension μl in die Berechnung eingehen.

Da sich Gl. (39) ausschließlich aus Produkten/Quotienten zusammensetzt, kann nach Doerffel [222] die vereinfachte Formel für die Fehlerfortpflanzung verwendet werden:

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \sqrt{\left(\frac{\Delta A_i}{A_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta A_{1\mu\text{g}}}{A_{1\mu\text{g}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_i}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_e}{V_e}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_a}{V_a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_w}{V_w}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{\text{inj}}}{V_{\text{inj}}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta WF}{WF}\right)^2} \quad (40)$$

Nun können die in den vorigen Abschnitten berechneten Fehler eingesetzt werden. Da die Messung der aktuellen Peakfläche und der Referenzfläche aus der Spektrenbibliothek zeitlich weit auseinanderliegen, muss für den Fehler der Peakflächen hier die laborinterne Vergleichspräzision angesetzt werden. Es gilt demnach: $VK(A_i) = VK(A_{1\mu\text{g}}) = 8 \%$, $VK(V_i) = VK(V_e) = VK(V_a) = VK(V_w) = 1 \%$ (Pipettierfehler) und $VK(WF) = 10 \%$. Der Fehler des Injektionsvolumens ($VK(V_{\text{inj}}) = 0,3 \%$) soll hier vernachlässigt werden. Dann folgt:

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \sqrt{2 \times 0,08^2 + 4 \times 0,01^2 + 0,1^2} = \sqrt{0,0232} = 0,152 \quad (41)$$

Gelten also die getroffenen Abschätzungen für die Einzelfehler, resultiert ein Gesamtfehler für die bestimmte Konzentration in Höhe von 15,2 %. Würde ein Fehler der Wiederfindung von 20 % zugrundegelegt, ergäbe sich ein Gesamtfehler von 23,1 %.

Die Formel zur Berechnung der Konzentration nach Eiweißfällung mit Quantifizierung über die Referenzfläche aus der Spektrenbibliothek lautet:

$$c_i = \frac{A_i \times V_{i+e} \times 1.000 \mu\text{l} / \text{ml}}{A_{1\mu\text{g}} \times V_i \times V_{\text{inj}}} \quad (42)$$

mit V_{i+e} = Gesamtvolumen aus Probenvolumen (V_i) und zugesetztem Fällungsmittel (V_e , meist Acetonitril). Demnach gilt hier:

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \sqrt{\left(\frac{\Delta A_i}{A_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta A_{I\mu g}}{A_{I\mu g}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{i+e}}{V_{i+e}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_i}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{inj}}{V_{inj}}\right)^2} \quad (43)$$

Ebenfalls nach Doerffel [222] gilt:

$$\Delta V_{i+e}^2 = \Delta V_i^2 + \Delta V_e^2 \quad (44)$$

und somit:

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \sqrt{\left(\frac{\Delta A_i}{A_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta A_{I\mu g}}{A_{I\mu g}}\right)^2 + \frac{\Delta V_i^2 + \Delta V_e^2}{(V_i + V_e)^2} + \left(\frac{\Delta V_i}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_{inj}}{V_{inj}}\right)^2} \quad (45)$$

Legt man eine 1:1-Fällung ($V_i = V_e$) zugrunde und setzt erneut die Einzelfehler ein, so ergibt sich:

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \sqrt{0,01^2 + 0,08^2 + 1,5 \times 0,01^2 + 0,003^2} = \sqrt{0,006659} = 0,082 \quad (46)$$

Hier läge der Gesamtfehler also bei etwa 8 %. Es wird bei diesem Verfahren grundsätzlich eine einhundertprozentige Wiederfindung unterstellt.

Für die Eiweißfällung lagen - anders als für die beiden anderen Verfahren – auch empirische Ergebnisse vor. Im Rahmen einer Studie der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Berliner Charité wurde durch den Autor in insgesamt 518 Serumproben von 79 verschiedenen Patienten mittels Eiweißfällung die Konzentration des Anästhetikums Propofol bestimmt. Nach Abzug der jeweils mituntersuchten Leerseren (Probenabnahme vor Gabe des Medikaments) und derjenigen Proben, bei denen das Probenmaterial nur für eine Einfachbestimmung ausreichte, verblieben 324 Proben, die in Doppelbestimmung analysiert wurden. Bei Serumkonzentrationen zwischen 0,1 und 40 $\mu g\ ml^{-1}$ wurde eine mittlere Abweichung der Einzelbestimmungen vom jeweiligen Mittelwert der Doppelbestimmung in Höhe von 3,3 % gefunden, bei einer Standardabweichung von 3,7 %. Der in Gl. (46) berechnete Wert wurde in diesem Fall im Durchschnitt somit noch unterschritten, angesichts der hier gefundenen Standardabweichung des Fehlers kann er aber als realistische Schätzung akzeptiert werden.

Für das Standardadditionsverfahren lautet unter der Voraussetzung, dass beide Proben (mit und ohne Zusatz) unter den gleichen Verfahrensbedingungen (Volumen des Extraktionsmittels, Injektionsvolumen etc.) analysiert werden, die Formel zur Berechnung der Konzentration:

$$c_i = \frac{A_i \times c_z}{(A_{i+z} - A_i)} = \frac{A_i \times c_z}{A_z} = \frac{A_i \times n_z}{A_z \times V_z} \quad (47)$$

Erneut lässt sich die Fehlerfortpflanzung über die doerffelsche Formel berechnen:

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \sqrt{\left(\frac{\Delta A_i}{A_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta A_z}{A_z}\right)^2 + \left(\frac{\Delta n_z}{n_z}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_z}{V_z}\right)^2} \quad (48)$$

Aus $A_z = A_{i+z} - A_i$ und $\Delta A_z = \Delta A_{i+z}^2 + \Delta A_i^2$ folgt:

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \sqrt{\left(\frac{\Delta A_i}{A_i}\right)^2 + \frac{\Delta A_{i+z}^2 + \Delta A_i^2}{(A_{i+z} - A_i)^2} + \left(\frac{\Delta n_z}{n_z}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_z}{V_z}\right)^2} \quad (49)$$

In der Praxis wird die Konzentration des Zusatzes, c_z , i. d. R. deutlich höher gewählt als c_i . Dann gilt $A_{i+z} \gg A_i$ und folglich $\Delta A_{i+z} \gg \Delta A_i$, und es ergibt sich näherungsweise:

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \sqrt{\left(\frac{\Delta A_i}{A_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta A_{i+z}}{A_{i+z}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta n_z}{n_z}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_z}{V_z}\right)^2} \quad (50)$$

Da für den $VK(A_{i+z})$ hier die Wiederholpräzision eingesetzt werden kann, gilt:

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \sqrt{0,01^2 + 0,01^2 + 0,01^2 + 0,01^2} = \sqrt{0,0004} = 0,020 \quad (51)$$

Bei dieser Vorgehensweise würde also nur ein Fehler von 2 % resultieren. Dabei wird jedoch - wie in der Praxis - unterstellt, dass bei beiden Messungen exakt dieselben Wiederfindungsraten erzielt wurden. Diese Annahme scheint, insbesondere vor dem Hintergrund der Schwankungen der in Tab. 44, S. 144 dargestellten Ergebnisse, jedoch fragwürdig. Des weiteren müssen für die Fehlerabschätzung auch die bei den einzelnen experimentellen Schritten auftretenden Volumenfehler berücksichtigt werden. In einer realistischeren Einschätzung ergibt sich daher ein zu Gl. (40) analoger Ausdruck:

$$\frac{\Delta c_i}{c_i} = \sqrt{\left(\frac{\Delta A_i}{A_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta A_{i+z}}{A_{i+z}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_i}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_e}{V_e}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_a}{V_a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V_w}{V_w}\right)^2 + \left(\frac{\Delta WF}{WF}\right)^2} \quad (52)$$

Anders als dort kann hier jedoch für die Peakflächen die Wiederholpräzision ($VK(A_i) = VK(A_{i+z}) = 1\%$) angesetzt werden, da die Messung der einfachen Probe und derjenigen mit Zusatz in unmittelbarer zeitlicher Nähe erfolgen. Nach Einsetzen der entsprechenden Zahlenwerte ergibt sich für c_i ein VK von 10,3 %. Bei einem $VK(WF)$ von 20 % würde allerdings ein Wert von 20,1 % errechnet, mit wachsender Schwankung der Wiederfindung würde diese demnach den Gesamtfehler der Konzentration dominieren.

Bei den vorgestellten Betrachtungen konnte die Konzentrationsabhängigkeit des relativen Fehlers nicht mit berücksichtigt werden. Horwitz [223] (zitiert in [157]) leitete auf der Basis von annähernd 3.000 Ringversuchen für die maximal akzeptable Streuung (VK_{max}) eine empirische Gleichung ab:

$$VK_{max} = 2^{(1-0,5 \times \log c)} \quad (53)$$

Hierbei bezeichnet c die Konzentration des Analyten in der Probe in dezimaler Ausdrucksweise ($c = 1$ bei Reinsubstanz, $c = 10^{-6}$ bei einer Konzentration von 1 ppm). Der gleiche Autor fand empirisch eine gegenüber der Vergleichspräzision um den Faktor 0,5 bis 0,75 niedrigere Wiederholpräzision. In [157] wurden die daraus resultierenden tolerierbaren VK in einer Tabelle zusammengefasst, aus der hier die für den in der STA relevanten Konzentrationsbereich berechneten Ergebnisse wiedergegeben werden sollen (Tab. 45).

Tab. 45: Auszug aus einer aus [157] entnommenen Tabelle, in der für verschiedene Analytkonzentrationen die Ergebnisse von Gl. (53) wiedergegeben sind. Konzentrationen > 10 ppm spielen in der STA meist keine Rolle, solche < 1 ppb liegen nur in Ausnahmefällen innerhalb der Reichweite der HPLC-DAD. Für den Unterschied zwischen Wiederhol- und Vergleichspräzision wurde ein mittlerer Faktor von 0,67 zugrundegelegt.

Konzentration	VK _c (Wiederholbedingungen) / %	VK _c (Vergleichsbedingungen) / %
10 µg ml ⁻¹ (10 ppm)	7,3	10,9
1 µg ml ⁻¹ (1 ppm)	11	16,42
100 ng ml ⁻¹ (100 ppb)	15	22,39
10 ng ml ⁻¹ (10 ppb)	21	31,34
1 ng ml ⁻¹ (1 ppb)	30	44,78

Shah et al. [158] geben für die Kalibration einer bioanalytischen Methode eine akzeptable Streuung der Messwerte an den einzelnen Kalibrationspunkten von $\pm 15\%$ an (im Bereich der Bestimmungsgrenze: 20 %).

Alles in allem kann festgehalten werden, dass sich die in der vorliegenden Arbeit gefundenen VK im Bereich von 10- 20 % in der Größenordnung der für Analysen aus biologischem Material als akzeptabel angesehenen Werte bewegen. Da die Wiederfindungsversuche (Abschnitt 4.7.3) mit Konzentrationen von 10 µg ml⁻¹ bestimmt wurden, die Langzeitmessungen der Peakflächen bei einer Coffeinkonzentration von 1 µg ml⁻¹, sind insbesondere die ersten beiden Zeilen von Tab. 45 als relevant anzusehen.

Wegen des großen Einflusses des Fehlers der Wiederfindung auf den Gesamtfehler (Ausnahme: Eiweißfällung) wäre es empfehlenswert, ersteren wenigstens für den Kreis der in der STA wichtigsten Substanzen genauer zu bestimmen. Dies müsste allerdings idealerweise für jede Substanz mindestens für eine hohe und eine niedrige Konzentration in Mehrfachbestimmung und in (dotierten Leer-) Blutproben verschiedener Patienten erfolgen. Bei einer Fünffachbestimmung an zwei Konzentrationen in fünf verschiedenen Proben wären somit bereits 50 Messungen für eine einzige Substanz durchzuführen, womit deutlich wird, dass für die bei der STA relevante Substanzzahl ein nicht mehr tragbarer Aufwand entstehen würde.

Die Alternative bestünde darin, den Gesamtfehler von vorneherein bewusst hoch zu schätzen (vielleicht eher auf 20 – 30 %) und somit dem Ergebnis einen eher semiquantitativen Charakter zuzuschreiben. Für die toxikologische Einordnung der gemessenen Konzentration anhand von Referenzdaten finden in der Praxis ohnehin nur eher grobe Kategorien Anwendung (therapeutisch / toxisch / komatös-letal, vgl. Abschnitt 4.7.1), so dass die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse als insgesamt für die Systematische Toxikologische Analyse ausreichend eingeschätzt werden.

4.8 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Ein großes Problem bei der pauschalen Einschätzung der Leistungsfähigkeit der HPLC-DAD für die STA stellt die Ermittlung von Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen (NG/BG) dar. Ihre Bedeutung ist elementar: liegt aufgrund zu niedriger Wirkstoffkonzentrationen gar kein

verwendbares Messsignal vor, sind schließlich die besten Selektivitäts- oder Präzisionswerte nutzlos.

Als Methode für die Bestimmung der NG/BG steht im Grunde genommen nur die Abschätzung über das Signal-Rausch-Verhältnis (vgl. Abschnitte 2.3.5 und 4.5.4) zur Verfügung: das Leerwertverfahren scheidet aus Mangel an universell repräsentativen Leerseren ebenso aus wie das für die STA viel zu aufwändige Kalibriergeradenverfahren (beide Methoden: s. DIN 32645 [160]). Die Ergebnisse aus Abschnitt 4.5.4 lassen den Schluss zu, dass die UV-Spektren, wie gefordert, im Bereich der Bestimmungsgrenze (zehnfaches Grundrauschen) mit hinreichender Genauigkeit gemessen und - sofern sie einigermaßen strukturiert sind - im Bereich der Nachweisgrenze (dreifaches Grundrauschen) auch noch erkannt werden können.

Das Hauptproblem liegt jedoch in der Tatsache, dass die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze durch eine Vielzahl sowohl substanz- als auch probenspezifischer Faktoren bestimmt werden, die eine allgemeingültige Abschätzung unmöglich machen und von denen hier nur einige genannt werden sollen:

Für die Ermittlung der NG/BG über das Signal-Rausch-Verhältnis ist die Peakhöhe entscheidend. Dabei weisen aufgrund der mit der Retentionszeit zunehmenden Peakbreite später eluierende Substanzen bei gleicher Peakfläche auf der betreffenden Wellenlänge niedrigere Peakhöhen und damit höhere (also "schlechtere") NG/BG auf als früher eluierende.

Abhängig vom enthaltenen Chromophor/Absorptionssystem und zusätzlich von dessen Massenanteil in der Verbindung besitzen die untersuchten Verbindungen massenbezogen z. T. sehr unterschiedliche spezifische Extinktionen (der Bezug auf die Masse anstelle der sonst in der UV-Spektroskopie gebräuchlicheren Stoffmenge ergibt sich hier aus der Angabe der NG/BG in $\mu\text{g ml}^{-1}$). Dies führt erfahrungsgemäß bei gleicher absolut gemessener Substanzmasse zu einer substanzabhängigen Schwankung der Peakflächen im Bereich von ein bis zwei Größenordnungen; so wurden bei der für die Spektrenbibliothek einheitlich bei $225 \pm 5 \text{ nm}$ (und damit allerdings oft nicht im Optimum) durchgeführten Messung der Peakflächen für je $1 \mu\text{g}$ Substanz im Mittel $(2,2 \pm 1,8) \times 10^6$ Flächeneinheiten gefunden, mit Extremwerten von etwa $0,1 \times 10^6$ bzw. $1,9 \times 10^7$ Flächeneinheiten.

Der Umstand, dass die Peakhöhe mit zunehmender Retentionszeit bei gleichzeitiger Peakverbreiterung deutlich abnimmt, führt außerdem dazu, dass bei gleicher spezifischer Extinktion bei früher eluierenden Verbindungen niedrigere NG/BG erreicht werden als bei länger retinierten.

Ein weiteres Problem stellen diejenigen Substanzen dar, die unter Verwendung der Standardprobenaufbereitungsverfahren nur mit sehr schlechten Extraktionsausbeuten extrahiert werden können.

Nicht nur das Messsignal des Analyten, auch das Rauschen ist verschiedenen Einflussfaktoren unterworfen: seine Intensität hängt von der betrachteten Wellenlänge ab (vgl. Abb. 25, S. 83), von der Sauberkeit des Extraktes (auch die Anwesenheit geringer Mengen koeluierender Substanzen kann die NG/BG deutlich anheben), von der Sauberkeit des Eluenten (gerade bei der Kreislauflührung), sowie vom technischen Zustand der Anlage (Konstanz des Flusses, Lampenenergie, Sauberkeit der Durchflusszelle und der optischen Bauteile des DAD).

Schließlich unterscheiden sich auch von der toxikologischen Seite aus die substanzabhängig zu fordernden Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen ganz erheblich. In der bereits mehrfach zitierten Übersicht von Regenthal et al. [206] finden sich z. T. Medikamentwirkstoffe mit therapeutischen Wirkspiegeln im Bereich einiger hundert pg ml^{-1} (etwa bei Digoxin, bei dem selbst die Untergrenze des komatös-letalen Konzentrationsbereiches mit 5 ng ml^{-1} angegeben wird). Selbst wenn im Rahmen der STA sicherlich eher der toxische Konzentrationsbereich von Interesse ist, liegen dort die niedrigsten Werte bei einigen ng ml^{-1} , wobei für viele gerade der niedrig dosierten Wirkstoffe überhaupt keine Angaben gemacht werden. Für nicht in Medikamenten enthaltene toxikologisch relevante Substanzen stehen solche Daten ohnehin meist nicht zur Verfügung. Insbesondere pflanzliche oder bakterielle Toxinen erreichen toxische Wirkstärken bereits bei Blutspiegeln, die allenfalls noch mit mehrdimensionaler MS-Detektion und/oder immunchemischen Mitteln nachgewiesen werden können.

Eine allgemeine Abschätzung erreichbarer Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen ist auf dem Papier aufgrund der Vielzahl eingehender Faktoren kaum möglich. Erfahrungen aus der Praxis (vgl. z. B. [34]) zeigen allerdings, dass regelmäßig für die Bestimmung nach Extraktion mit Dichlormethan Werte zwischen 10 und (in Ausnahmefällen) 500 ng ml^{-1} , bei der Eiweißfällung zwischen 100 ng ml^{-1} und $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ gefunden werden. Wird eine genauere Schätzung gewünscht, so ist die konkrete Durchführung einer Abschätzung der NG/BG aus dem Grundrauschen ohne besonderen Aufwand praktikabel und besitzt darüber hinaus den Vorzug, dass die Ergebnisse aus den Bedingungen der tatsächlichen Messung abgeleitet werden.

5 ANWENDUNGSBEISPIELE

5.1 Polyintoxikation mit verschiedenen Hypnotika

Bei dem ersten, hier vorgestellten Fallbeispiel handelte es sich um einen 45jährigen Patienten, der mit Verdacht auf eine Tablettenintoxikation am 8. Juli 2002 in die Rettungsstelle des Berliner Universitätsklinikums Charité eingeliefert wurde. Nach Benachrichtigung des Rufbereitschaftsdienstes im Institut für Rechtsmedizin wurde um 20.45 Uhr eine Blutprobe entnommen, die zusammen mit einer Urinprobe des Patienten um 21.00 Uhr in der Abt. Toxikologische Chemie einging. Auf dem Antragsformular wurden neben der Anamnese Suizidversuch auch als eventuell eingenommene Substanzen die Wirkstoffe Zopiclon, Nitrazepam und Flurazepam sowie die Medikamente Stilnox und Bikalm (Wirkstoff bei beiden: Zolpidem) angegeben. Bei allen angegebenen Wirkstoffen handelte es sich um Schlaf- bzw. Beruhigungsmittel (Hypnotika / Sedativa). Der Zeitpunkt der letzten Einnahme war fraglich, diese war eventuell schon am Abend zuvor erfolgt. Der klinische Zustand wurde als wach und kreislaufstabil beschrieben

Bereits um 21.09 Uhr lag das Ergebnis für die Immunoassays aus Urin vor: lediglich die Gruppe der Benzodiazepine war positiv getestet worden. Die Blutalkoholbestimmung verlief mit negativem Ergebnis ($0,0 \text{ mg g}^{-1}$ Ethanol). Wie üblich wurden ein saurer und ein basischer Dichlormethanextrakt sowie eine Eiweißfällung angefertigt. Das Chromatogramm des basischen Extraktes, das um 22.03 Uhr vorlag, wird in Abb. 66 wiedergegeben.

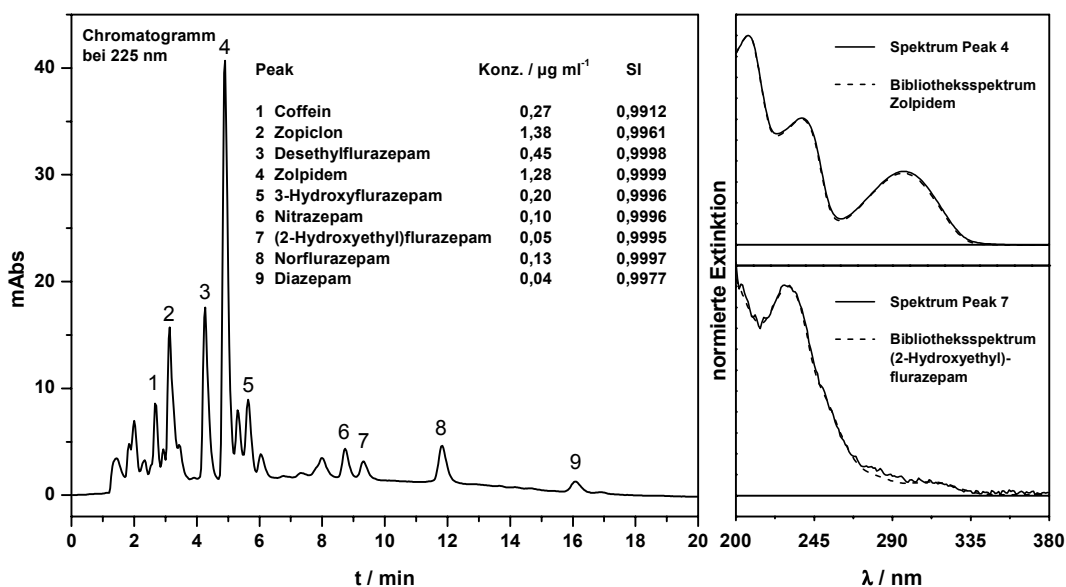


Abb. 66: Chromatogramm (225 nm) des basischen Blutextraktes eines mit Verdacht auf Tablettenvergiftung in die Rettungsstelle des Berliner Universitätsklinikums Charité eingelieferten 45jährigen Patienten. Die angegebenen Konzentrationen wurden auf der Grundlage der in der Spektrenbibliothek gespeicherten Peakflächen ermittelt und sind nach den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Schätzungen (s. Abschnitt 4.7.5) mit einem relativen Fehler von etwa 15 % behaftet. Die beiden Flurazepam-Metabolite 3 und 5 waren nicht in der Bibliothek enthalten, konnten aber aufgrund früherer Erfahrungen und ihres UV-Spektrums eindeutig zugeordnet werden. Flurazepam selbst (mit einer zu erwartenden RT von etwa 7,3 min) wurde nicht mehr gefunden. Die Abbildungen im rechten Teil illustrieren die gute spektrale Übereinstimmung sowohl bei vergleichsweise hohen ($> 1 \mu\text{g ml}^{-1}$, oben) als auch bei relativ niedrigen Konzentrationen (50 ng ml^{-1} , unten).

Neun der etwa zwanzig Peaks des Chromatogramms konnten durch Bibliothekssuche identifiziert werden. Sie wurden mit $SI > 0,999$ (sechs Peaks) bzw. zwischen 0,991 und 0,998 (drei Peaks) jeweils als bester Treffer in der Liste potentieller Kandidaten gefunden, wobei die Peaks der drei mit schlechterem SI identifizierten Wirkstoffe entweder partiell überlagert waren (Coffein, Zopiclon) oder bereits einer sehr niedrigen Wirkstoffkonzentration entsprachen (Diazepam, ca. 40 ng ml^{-1}). Zwei der nicht identifizierbaren Peaks $RT = 5,3$ bzw. $6,0 \text{ min}$ wiesen typische Benzodiazepinspektren auf, entsprachen aber keinem Bibliothekseintrag mit hinreichender Übereinstimmung.

Zwei der drei Flurazepam-Metabolite waren nicht in der Spektrenbibliothek enthalten, konnten aber aufgrund ihres Spektrums und der Kenntnis der Retentionszeiten aus früheren Messungen eindeutig zugeordnet werden. Wie die auf die Muttersubstanz Flurazepam bezogenen SI-Werte zeigen, wird bei beiden durch die Metabolisierung das UV-Spektrum nur unwesentlich beeinflusst. Flurazepam selbst, das bei etwa 7,3 Minuten eluiert wäre, war bei einer Plasmahalbwertszeit zwischen einer und drei Stunden hier aufgrund der länger zurückliegenden Einnahme nicht mehr eindeutig bestimmbar.

Tab. 46 zeigt die Abweichungen von den Bibliothekswerten der RRT (bzw. im Falle der beiden nicht in der Bibliothek enthaltenen Flurazepam-Metaboliten diejenige von den einige Monate zuvor bei einem anderen Fall bestimmten Werten). Zusätzlich sind die "Listenlängen" nicht unterscheidbarer Wirkstoffe (einschließlich der jeweiligen Substanz selbst) mit angegeben.

Tab. 46: Abweichungen der RRT-Werte der identifizierten Verbindungen von den in der Spektrenbibliothek gespeicherten Referenzwerten (Peaks 3 und 5: Vergleich mit früheren Messungen). Zusätzlich sind die in diesem Fall gültigen Listenlängen mit angegeben.

Peaknummer	Substanz	RRT_{Messung}	$RRT_{\text{Bibliothek}}$	ΔRRT	VK_{RRT}	SI	LL_{UV}^1	LL_{UV+RRT}^2
1	Coffein, partiell überlagert	0,082	0,087	0,005	5,7	0,9912	16	1
2	Zopiclon, partiell überlagert	0,127	0,127	0,000	0,0	0,9961	1	1
3	Desethylflurazepam	0,237	-	-	-	0,9998 ³	-	-
4	Zolpidem	0,298	0,295	0,003	1,0	0,9999	1	1
5	3-Hydroxyflurazepam	0,369	-	-	-	0,9996 ³	-	-
6	Nitrazepam	0,668	0,664	0,004	0,6	0,9996	2	1
7	(2-Hydroxyethyl)flurazepam	0,723	0,736	0,013	1,8	0,9995	2	1
8	Norflurazepam	0,968	0,984	0,016	1,6	0,9997	3	1
9	Diazepam	1,377	1,381	0,004	0,3	0,9977	1	1

¹ Zugrundegelegt wurde der jeweils passende Schwellenwert für den SI, also $SI > 0,990$ für Peak 1, $SI > 0,995$ für Peak 2 und Peak 7 und $SI > 0,9990$ für die anderen Peaks.

² Neben den unter ¹ genannten Schwellenwerten wurde hier angesichts der geringen Abweichungen von den in der Bibliothek gespeicherten RRT-Werten ein RRT-Fenster von 1s festgelegt.

³ Dieser Wert bezieht sich auf den Vergleich mit der Muttersubstanz Flurazepam.

Die Abweichungen von den Referenzwerten der RRT lagen bei allen Verbindungen unterhalb von 2 %, mit Ausnahme des teilweise überlagerten Coffeins, das um knapp 6 % abwich (für den frühen RT-Bereich vgl. hierzu die Diskussion in den Abschnitten 4.4.2 und 4.4.3). Somit fielen die Abweichungen deutlich geringer aus, als es dem in Abb. 18, S. 72 dargestellten Fehler der

RRT für ein 1s-Fenster entsprochen hätte. Hierdurch wurde die Einschätzung, dass das in der vorliegenden Arbeit als maßgeblich angesehene RRT-Fenster von 2s zu einer zu schlechten Einschätzung der Methodenselektivität führt, deutlich bestätigt.

Die Analyse des sauren Extraktes sowie der Eiweißfällung ergaben keine zusätzlichen Anhaltspunkte für das Vorliegen weiterer vergiftungsrelevanter Substanzen; allerdings konnten auf diese Weise eine Reihe hydrophiler Verbindungen mit schlechter Extraktionsausbeute in Dichlormethan, aber guter Bestimmbarkeit in der Fällung (z. B. Paracetamol oder Salicylsäure) ausgeschlossen werden.

Insgesamt wurde – knapp zwei Stunden nach Benachrichtigung der Rufbereitschaft – der Befund einer Polyintoxikation mit Diazepam, Flurazepam, Nitrazepam, Zolpidem und Zopiclon an die behandelnden Ärzte übermittelt. Die letztgenannten drei Wirkstoffe wurden dabei trotz des vermuteten langen Zeitraums, der seit der Einnahme vergangen war, noch mit toxischen Wirkspiegeln gefunden, auch bei Flurazepam deutete die gefundene Gesamtmenge an Metaboliten auf eine Dosis im toxischen Bereich hin. Trotz dieser Werte wurde die Vergiftung durch den Patienten jedoch überlebt, bei einer Kontrolluntersuchung am nächsten Tag waren die gefundenen Wirkstoffe nur noch mit "therapeutischen" Wirkspiegeln nachweisbar.

5.2 Letale Intoxikation mit Chloroquin in Kombination mit Alkohol und Diphenhydramin

Das folgende Beispiel schildert den im Auftrag der Staatsanwaltschaft untersuchten Fall einer 54jährigen Verstorbenen (Sektionsnummer SN 157/02), die laut Polizeiakte am 26. März 2002 gegen 12.30 Uhr leblos in ihrer Wohnung aufgefunden wurde, nachdem sie am 24. März letztmalig lebend gesehen worden sei. Neben dem Bett seien auf einem Nachttisch zahlreiche Fläschchen mit ihrer Bezeichnung nach homöopathischen Mitteln gefunden worden, dazu habe eine leere Weinflasche neben dem Bett gelegen. Auf einem Tisch seien diverse Papiere, teilweise mit Abschiedsbriefcharakter, gefunden worden, darunter auch ein Mitgliedsausweis der Deutschen Gesellschaft für Humanes Sterben sowie eine letzte Willenserklärung. Die Betroffene habe unter schweren Allergien gelitten, sie sei in der Zeit vor ihrem Tod depressiv gewesen und habe über Schmerzen geklagt. Eine Woche zuvor habe eine Nachbarin für sie in der Apotheke Schmerzmittel besorgt. Konkrete Hinweise über eingenommene Substanzen lagen jedoch nicht vor.

Die Obduktion ergab nach Angaben des Obduzenten keine morphologisch fassbare Todesursache, daher wurde zur Prüfung auf eine Vergiftung durch Alkohol, Drogen oder Medikamente eine toxikologisch-chemische Untersuchung angeordnet. Von den asservierten Organen und Körperflüssigkeiten wurden im Rahmen der Analysen Blut, Urin, Mageninhalt und Leber untersucht.

Sämtliche EMIT-Immunoassays im Urin verliefen mit negativem Ergebnis. Die Blutalkoholbestimmung mittels ADH-Verfahren und HS-GC erbrachte dagegen sowohl im Blut als auch im Urin Konzentrationen von 1,0/1,1 mg g⁻¹ (ADH) bzw. 1,1/1,2 mg g⁻¹ (HS-GC) Ethanol. Des weiteren wurde durch Messung mittels ionenselektiver Elektrode eine Zyanidvergiftung ausge-

schlossen. Ein Screening mittels GC-MS auf illegale Drogen in Blut und Urin wurde ebenfalls mit negativem Resultat durchgeführt. In den mit HPLC-DAD untersuchten Blutproben wurden die Wirkstoffe Chloroquin (Antimalariawirkstoff, auch Antirheumatikum) sowie Diphenhydramin gefunden (Tab. 47).

Tab. 47: Übersicht über die gefundenen Wirkstoffkonzentrationen in den mittels HPLC-DAD untersuchten Proben.

Wirkstoff	Konzentration (Blut)	Konzentration (Mageninhalt)
Chloroquin	15 $\mu\text{g ml}^{-1}$	415 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Diphenhydramin	0,67 $\mu\text{g ml}^{-1}$	32 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Die im Blut gefundene Chloroquinkonzentration lag deutlich im komatös-letalen Wirkungsbereich und konnte somit als todesursächlich angenommen werden. Beim Diphenhydramin, dessen Konzentration im oberen therapeutischen Bereich lag, handelt es sich eigentlich um ein Antihistaminikum, das allerdings hauptsächlich als Schlafmittel Verwendung findet. Es ist nicht rezeptpflichtig und somit über die Apotheken für jedermann frei zugänglich, weshalb es gerade im Zusammenhang mit Suizid(versuch)en häufig in den untersuchten Proben gefunden wird.

Ausgehend von der Polizeiakte ging im vorliegenden Fall die kombinierte Einnahme der beiden Wirkstoffe vermutlich auf eine Empfehlung der "Deutschen Gesellschaft für Humanes Sterben" zurück, wobei das Diphenhydramin hier als Antiemetikum eingesetzt wurde, um ein Erbrechen der eingenommenen Überdosis Chloroquin zu verhindern. Durch den festgestellten Alkoholspiegel von etwa 1,1 ‰ dürfte die Betroffene zusätzlich gedämpft und in ihrer Handlungsfähigkeit eingeschränkt worden sein.

Abb. 67 zeigt das Chromatogramm des basischen Blutextraktes. Es kann als Beispiel dafür dienen, welche Konzentrations- und damit auch Größenunterschiede der Messsignale im Rahmen der STA innerhalb einer Messung erfasst werden müssen.

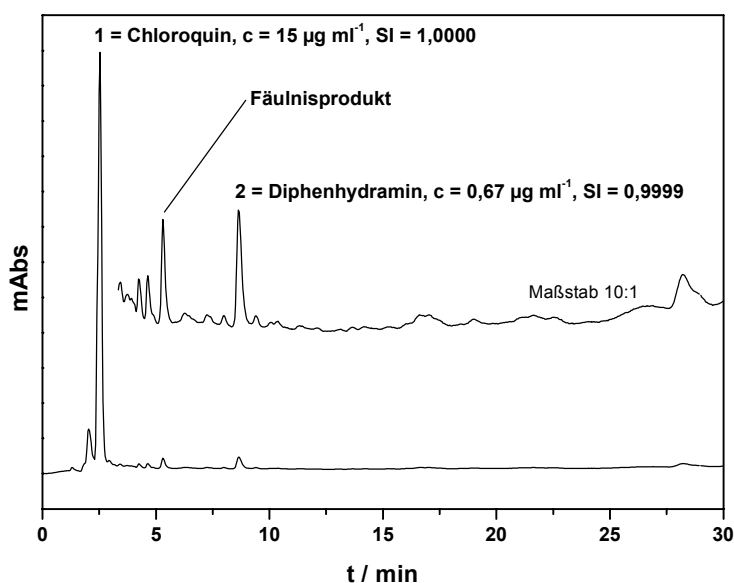


Abb. 67: Chromatogramm (225 nm) des basischen Blutextraktes einer 54-jährigen Verstorbenen.

Während die Identifikation des Chloroquins aufgrund des extrem charakteristischen UV-Spektrums ohne Probleme möglich war, besitzt das Diphenhydramin ein weniger einzigartiges Spektrum (Abb. 68).

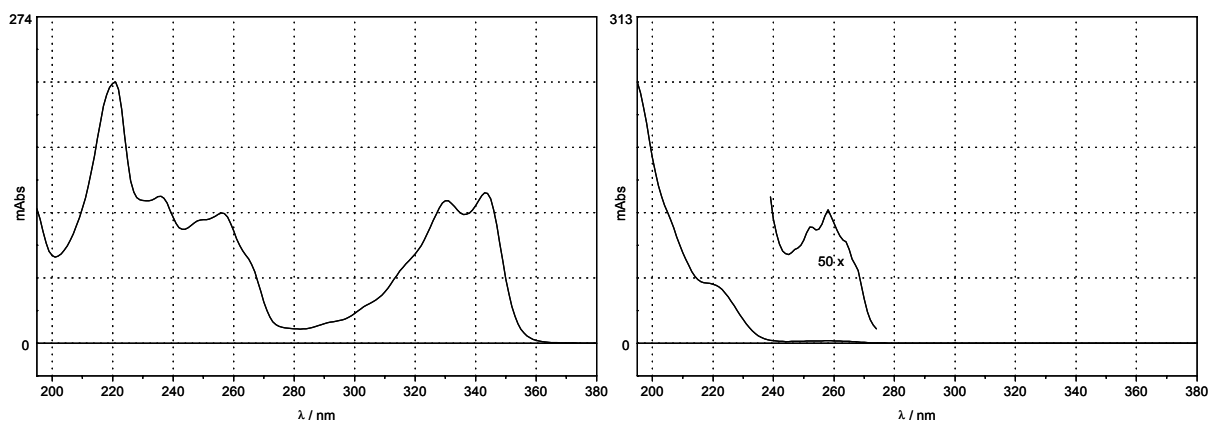


Abb. 68: UV-Spektren der gefundenen Wirkstoffe Chloroquin (links) und Diphenhydramin (rechts).

Für ein Retentionszeitfenster von ± 2 s (zweifache Standardabweichung der absoluten Retentionszeit) und einen Schwellenwert für den SI $> 0,9990$ ist der Wirkstoff zwar eindeutig identifizierbar, bei SI $> 0,995$ gibt es aber bereits zwei, bei SI $> 0,9900$ sogar sechs weitere Identifikationskandidaten. Günstigerweise werden oft - so auch in diesem Fall im Urin – zusätzlich die beiden Metabolite Diphenylmethoxyessigsäure und Desethylidiphenhydramin mit sehr ähnlichem UV-Spektrum gefunden, wodurch die Identifikation zusätzlich abgesichert werden kann.

5.3 Bestimmung flüchtiger Substanzen in einem Todesfall

Ein weiterer Vorteil eines vielseitigen Analyseverfahrens wie der HPLC-DAD liegt in der Möglichkeit, mit vergleichsweise geringem Mehraufwand aus der allgemeinen Methode Spezialverfahren abzuleiten. Dies soll im folgenden am Beispiel der Bestimmung von Lösungsmitteln (LM) und anderen flüchtigen Reagenzien aus Serum demonstriert werden (die Kasuistik wurde in [224] ausführlicher beschrieben). Einige wichtige in der Spektrenbibliothek enthaltene Vertreter dieser Substanzklasse sind in Tab. 48 zusammen mit ihren Listenlängen angegeben.

Tatsächlich stellt sich in der forensischen Toxikologie, insbesondere im Zusammenhang mit Verbrennungsoptern, aber auch bei Fällen, in denen in suizidaler Absicht Lösungsmittel aufgenommen wurden, des öfteren die Frage nach den Blutkonzentrationen derartiger Stoffe. Als Standardmethoden zur Bestimmung flüchtiger Substanzen sind die Headspace-Gaschromatographie (HS-GC) oder neuerdings auch die Headspace-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) zu sehen. Es galt aber zu untersuchen, inwieweit relevante Konzentrationen zumindest für die UV-aktiven LM auch in der normalen, ungerichteten Suchanalyse mittels HPLC-DAD gefunden würden.

Tab. 48: HPLC-Daten einiger wichtiger UV-absorbierender Lösungsmittel und anderer flüchtiger Reagenzien. Neben der relativen Retentionszeit sind auch die "Listenlängen" auf der Basis des UV-Spektrums (für die gesamte Bibliothek) und von RRT und Spektrum zusammengenommen (für den jeweiligen Eluenten) angegeben (vgl. Abschnitt 2.4.2).

Substanz	Eluent	RRT	LL _{UV}	LL _{UV+RRT}	Substanz	Eluent	RRT	LL _{UV}	LL _{UV+RRT}
Anilin	A	0,06	1	1	Methyliodid	A	0,66	1	1
Anisol	A	1,20	5	1	Naphthalin	B	0,55	1	1
Benzaldehyd	A	0,59	1	1	Nitrobenzol	A	1,03	1	1
Benzol	A	1,26	1	1	Nitromethan	A	0,17	5	2
Benzonitril	B	0,22	1	1	Phenylacetat	A	0,88	1	1
Benzylacetat	B	1,20	1	1	1-Phenylethanol	A	0,39	25	1
Benzylalkohol	A	0,35	22	2	2-Phenylethanol	A	0,39	22	3
Benzylamin	A	0,05	2	2	Phenylaceton	A	0,74	3	1
Brombenzol	B	2,66	1	1	Propylbenzoat	B	0,54	2	1
Schwefelkohlenstoff	A	1,16	5	5	Pyridin	A	0,03	1	1
Chlorbenzol	A	2,21	1	1	Styrol	A	2,70	1	1
Cumol	B	0,67	22	1	Tetrachlorethylen	B	0,63	1	1
Dimethylformamid	A	0,06	2	1	Toluol	A	2,12	22	2
Dimethylphthalat	B	1,90	1	1	Trichlorethylen	B	0,43	3	1
Dimethylsulfoxid	A	0,03	3	1	Vinylchlorid	A	0,74	2	1
Ethylbenzoat	A	1,93	2	1	o-Xylol	B	0,57	2	1
Ethylbenzol	B	0,58	21	1	m-Xylol	B	0,60	1	1
Isobutylnitrit	A	0,01	4	1	p-Xylol	B	0,60	1	1
Isopentylnitrit	A	0,02	4	3					

Tab. 49: Typische Konzentrationen einiger UV-absorbierender Lösungsmittel im Blut (Quellen: [220,225])

Lösungsmittel	Konzentration / $\mu\text{g ml}^{-1}$			
	Normalbereich	Am Arbeitsplatz	Toxischer Bereich	Bei Todesfällen
Benzol	0,0001 - 0,006	0,008 - 0,2	-	0,9 - 120 (8 Fälle)
Benzylalkohol	-	-	66 - 148	-
Dimethylsulfoxid	-	0,5 - 0,6 (dermal)	1,6 - 3,0	-
Styrol	bis 0,0009	0,0005 - 0,004	0,05 - 4,8	-
Tetrachlorethylen	-	0,0004 - 0,003	22	44, 115
Toluol	0,005 - 0,001	0,4 - 1,2	0,3 - 30; 0,8 - 7,7	10 - 48, 50 - 79
Trichlorethylen	-	-	16 - 57	3 - 110 (20 Fälle)
Xylol	0,0017	1 - 2,1	-	3 - 40, 110

Einige Literaturangaben zu typischen Blutkonzentrationen sind in Tab. 49 zusammengestellt.

Da die Extraktionsverfahren aus naheliegenden Gründen (wegen des enthaltenen Abdampfschrittes) für die Analyse leicht flüchtiger Verbindungen ungeeignet waren, fiel für die Probenaufarbeitung die Wahl auf die Eiweißfällung. Bei diesem Verfahren erfolgt allerdings - anders als bei der Extraktion - kein Anreicherungsschritt (die Probe wird im Gegenteil sogar noch

verdünnt), so dass zunächst zu prüfen war, ob die höheren Bestimmungsgrenzen zumindest für den toxischen Wirkungsbereich ausreichen würden. Hierzu wurden Probemessungen für 12 verschiedene Wirkstoffe bei vier verschiedenen Konzentrationen (dotierte Leerseren) in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse in Tab. 50 (folgende Seite) zeigen, dass zumindest diejenigen untersuchten Substanzen mit einigermaßen charakteristischem UV-Spektrum, also vor allem die Lösungsmittel mit substituiertem Phenylchromophor, alle noch bei $0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ bestimmbar waren. Damit sollte für diesen Substanzkreis die Bestimmung zumindest im Bereich toxischer Wirkspiegel (vgl. Tab. 49) grundsätzlich möglich sein.

Die Methode wurde am Beispiel eines Tötungsverbrechens (Sektionsnummer SN 006/00) angewendet. Der zunächst unbekannte und später identifizierte 22jährige Betroffene wurde von einem Spaziergänger in der Nähe einer Mülldeponie in unbedeutendem Zustand tot aufgefunden. Laut Polizeiakte habe der Leichnam Verletzungen an Hals und Kopf sowie Verbrennungen aufgewiesen. Bei der Obduktion sei Geruch nach Benzin auffällig gewesen, offensichtlich war das Opfer mit Benzin übergossen und angezündet worden.

Tab. 50: Bestimmbarkeit von im Serum gemessenen Lösungsmitteln. Die Zahl hinter dem Substanznamen gibt die Wellenlänge an, bei der das Chromatogramm aufgenommen wurde.

Substanz / Wellenlänge der Quantifizierung (in nm)	Bestimmbarkeit (Identifizierung und Quantifizierung) bei			
	$10 \mu\text{g ml}^{-1}$	$3 \mu\text{g ml}^{-1}$	$1 \mu\text{g ml}^{-1}$	$0,3 \mu\text{g ml}^{-1}$
Anisol / 225	+	+	+	+
Benzylalkohol / 206	+	+	+	+
Benzol / 206	+	+	+	+
Chlorbenzol / 206	+	+	+	+
Nitromethan / 200	+	+	-	-
2-Phenylethanol / 206	+	+	+	+
Schwefelkohlenstoff / 200	+	+	+	-
Tetrachlorethylen / 200	+	+	-	-
Trichlorethylen / 200	+	+	-	-
Toluol / 206	+	+	+	+
Vinylchlorid / 200	+	-	-	-
p-Xylol / 206	+	+	+	+

Die Herzblutprobe wurde nach Acetonitrilfällung mittels HPLC-DAD untersucht. Das Chromatogramm ist in Abb. 69 dargestellt.

Mit Hilfe der Spektrenbibliothek konnten fünf der abgebildeten Peaks als Benzol (Peak 2), Toluol (3), o- (5) bzw. m-/p-Xylol (7) sowie Naphthalin (6) identifiziert werden. Für die Quantifizierung wurden die für die Erstellung von Tab. 50 durchgeführten Messungen als Kalibrierung zugrundegelegt (r^2 jeweils $> 0,99$), Naphthalin wurde anhand der in der Spektrenbibliothek gespeicherten Peakfläche bei $1 \mu\text{g}$ quantifiziert.

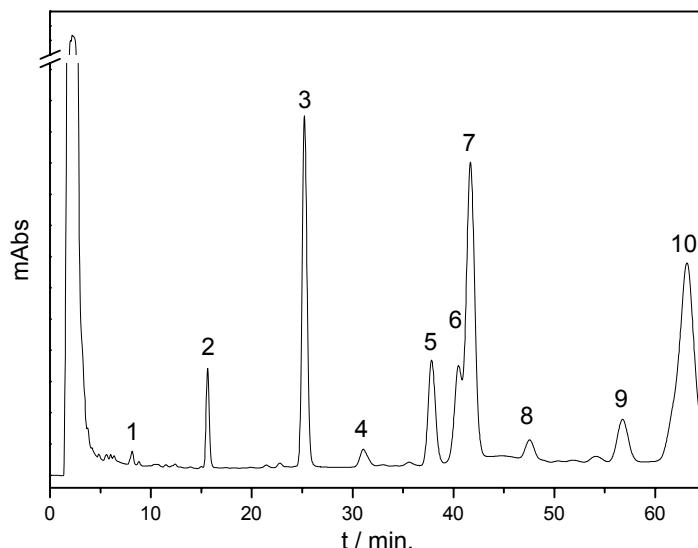


Abb. 69: Chromatogramm der Herzblutprobe im Fall SN006/00. Detektion bei 206 nm.

Die Ergebnisse sind in Tab. 51 angegeben. Die Zusammensetzung des Gemisches wies auf Fahrbenzin hin, das einen erheblichen Anteil aromatischer Bestandteile enthält.

Tab. 51: (Semi)quantitative Ergebnisse der HPLC-DAD-Untersuchung der Herzblutprobe im Fall SN 006/00.

Peak Nr.	Verbindung	Konzentration in $\mu\text{g ml}^{-1}$
2	Benzol	44
3	Toluol	180
5	o-Xylol	66
6	Naphthalin	42
7	m-Xylol + p-Xylol	ca. 240

Das Ergebnis ließ den Schluss zu, dass das Opfer zum Zeitpunkt des Übergießens mit Benzin noch gelebt hat. Derart hohe Konzentrationen im Herzblut, die im komatös-letalen Bereich liegen, können durch Aspiration des Benzins in die Lunge erklärt werden, von wo aus sie mit den letzten Schlägen noch ins Herz gelangten. Dieser Ablauf wurde später bei der Vernehmung der Täter bestätigt. In der Venenblutprobe wurden dagegen keine Benzinbestandteile nachgewiesen, so dass der Todeseintritt nicht ursächlich auf eine Lösungsmittelvergiftung zurückgeführt wurde.

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Insgesamt können aus den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Unter Berücksichtigung aller erzielten Untersuchungsergebnisse erwies sich die HPLC-DAD als im Hinblick auf die für die STA formulierten Anforderungen hervorragend geeignetes Analysenverfahren, das zu Recht, insbesondere wegen seiner guten Selektivitäts- und Präzisionswerte, aber auch wegen der unkomplizierten, schnellen und vergleichsweise kostengünstigen Probenaufbereitungsverfahren zu den wichtigsten Methoden für die Systematische Toxikologische Analyse zu zählen ist.
- Die im Rahmen der Arbeit gemessene und als Datengrundlage für die weiteren Berechnungen untersuchte UV-Spektrenbibliothek mit 2.682 Einträgen umfasst Wirkstoffe sämtlicher wichtiger Stoffgruppen und deckt den Kreis toxikologisch relevanter Substanzen gut ab.
- Insbesondere die sehr gute Qualität und Reproduzierbarkeit der gemessenen UV-Spektren, auch im Vergleich zwischen Geräten verschiedener Hersteller, bilden eine gute Basis für die Anwendung der HPLC-DAD im Rahmen der Systematischen Toxikologischen Analyse. Die Präzision der gemessenen und in der zur Spektrenbibliothek zugehörigen Datenbank gespeicherten RT- bzw. RRT-Werte liegt im Bereich in der Literatur publizierter Vergleichswerte. Ebenso liegen auch die für die quantitative Ergebnisunsicherheit ermittelten Werte im Rahmen des bei Analysen aus biologischem Material üblichen.
- Die Qualität der chromatographischen Trennung durch das verwendete isokratische Trennsystem muss hingegen als nicht befriedigend bewertet werden, insbesondere, da sich die betrachteten Substanzen nicht gleichmäßig über den Retentionszeitbereich verteilen. Wegen der im Einzelfall i. d. R. geringen Anzahl eingenommener Substanzen treten Peaküberlagerungen in der Praxis tatsächlich nur selten auf. Für die Substanzidentifizierung spielt die RRT nach dem UV-Spektrum nur eine sekundäre Rolle.
- Die Selektivität der HPLC-DAD kann nach Berechnung der Ähnlichkeits- bzw. Identifikationsmatrizen insgesamt als sehr gut eingestuft werden. Die gefundenen Werte (Spektrum + RRT, Eluent A) für die mittlere Listenlänge MLL (1,25) und die Discriminating Power DP (0,9999) liegen im Bereich der besten Literaturwerte. Bei einer Substanzzahl von nahezu 2.700 bzw. ca. 2.000 Substanzen sind über das UV-Spektrum alleine bereits über 60 %, auf der Basis der Kombination von Spektrum und RRT gut 84 % (mobile Phase A) bzw. 93 % (mobile Phase B) der untersuchten Substanzen eindeutig identifizierbar. In der Realität werden vermutlich noch deutlich bessere Werte erreicht, da aufgrund der nicht exakten Erfassbarkeit einiger Einflussfaktoren Annahmen z. T. betont konservativ bzw. im Rahmen von Worst-Case-Szenarien vorgenommen wurden.
- Keiner der untersuchten Selektivitätsparameter MLL, DP, RIP oder XM kann für sich alleine die Methodenselektivität hinreichend gut beschreiben. Besonders unbefriedigend ist die starke Abhängigkeit der Kenngrößen RIP, MLL und XM von der untersuchten Substanzzahl n. Die als einzige weitgehend von n unabhängige Discriminating Power DP ist andererseits zu unempfindlich gegenüber kleinen Änderungen von n. Daher wird für den Metho-

denvergleich eine Zusammenschau aller Parameter empfohlen, wobei zunächst die DP für eine grobe Voreinstufung verwendet werden sollte und dann zusätzlich die MLL, die RIP, sowie im Falle annähernd gleicher Substanzzahlen die neu abgeleitete mittlere Selektivität XM für den Vergleich hochselektiver Analysenverfahren eingesetzt werden sollten.

- Eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Methoden auf der Basis stark unterschiedlicher n ist vermutlich prinzipiell nicht gegeben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in diesem Zusammenhang, dass bei einer untersuchten Anzahl von etwa 2.000 Substanzen repräsentative Aussagen zu Selektivität und Spezifität möglich sind. Eine Untersuchung weiterer STA-Verfahren, allen voran der GC-MS, auf der Grundlage ähnlich großer Substanzzahlen wäre wünschenswert.
- Toxikologisch relevante Substanzen weisen eine hohe strukturelle Vielfalt bzgl. der enthaltenen Chromophore/Absorptionssysteme und somit auch eine große spektroskopische Variabilität auf. Insgesamt wurden im Substanzbestand der Spektrenbibliothek 1.486 verschiedene Chromophore bzw. (unter Berücksichtigung verschiedener Kombinationen derselben) 1.650 verschiedene Absorptionssysteme gezählt. 53,5 % der Wirkstoffe besitzen einen im Rahmen der Spektrenbibliothek einzigartigen Chromophor.
- Die Resultate der Diskriminanzanalyse belegen, dass Verbindungen mit unterschiedlichem Absorptionssystem mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit anhand ihrer UV-Spektren unterscheidbar sind. Substanzen mit demselben Absorptionssystem zeigen meist sehr ähnliche Spektren, es treten aber aufgrund struktureller Unterschiede im vom Absorptionssystem entfernteren Teil des jeweiligen Moleküls und einer damit verbundenen Veränderung der gesamten Molekülgeometrie oft noch gut messbare Unterschiede im Spektrum auf.
- Die Ähnlichkeit der Spektren von Substanzen mit gleichem Absorptionssystem kann unter Verwendung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Software Isis Base aufgebauten Substanz- bzw. Chromophorendatenbanken zur Richtigkeitskontrolle in Zweifelsfällen oder zur Identifizierung unbekannter Metabolite bekannter Wirkstoffe ausgenutzt werden. Auf diese Weise werden auch wertvolle Strukturinformationen über unbekannte Messsignale gewonnen. Die Ergebnisse der Anwendung der Diskriminanzanalyse auf die in der Spektrenbibliothek enthaltenen UV-Spektren belegen, dass letztere ein hohes Maß an struktureller Information enthalten; der Aufbau eines Expertensystems zur Wirkstoffklassifikation auf dieser Grundlage (und evtl. in Kombination mit weiteren Verfahren) erscheint - wenn auch vielleicht unter Anwendung verfeinerter Algorithmen - langfristig möglich.
- Die Anwendung multivariater chemometrischer Methoden auf vergleichsweise große Datensätze ist heute bereits mit relativ einfacher Desktopsoftware möglich, so dass einem breiteren Einsatz solcher Verfahren in der forensischen Toxikologie von der technischen Seite aus nichts im Wege steht. Sie könnten auch in anderen als den hier geschilderten Zusammenhängen Gewinn bringend auf die gemessenen Retentionszeiten, UV-Spektren oder sogar auf ganze Spektrochromatogramme angewendet werden: neben der Untersuchung von Struktur-Absorptions- bzw. Struktur-Retentions-Beziehungen ist dabei im forensischen Bereich auch die Identifikation von Naturstoff- oder Drogenprofilen zu nennen.
- Im Zusammenhang mit einer Erweiterung der methodischen Möglichkeiten im Bereich der Probenaufarbeitung erscheint vor allem die erwähnte Verwendung von Restricted-Access-

Materialien in Verbindung mit Säulenschaltungen zur Analytanreicherung nach Direktinjektion zentrifugierter Urin- und Blutproben für die Zukunft interessant. Auch die Kopplung der Festphasenmikroextraktion (SPME) mit der HPLC könnte das analytische Spektrum noch einmal erheblich erweitern, allerdings gelten die derzeit auf dem Markt befindlichen Injektionssysteme als noch nicht zuverlässig genug.

- Als besonders vielversprechendes STA-Verfahren ist für die Zukunft die Online-Kombination der Diodenarray- mit der massensensitiven Detektion zu bewerten (LC-DAD-MS), bei der sowohl die Gesamtselektivität, als auch die gerätebedingte Messpräzision und die Nachweisstärke sicherlich noch einmal stark verbessert würden. In einem solchen Detektionssystem sollten praktisch kaum noch Substanzen ohne eindeutig identifizierbare Struktur auftreten.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Systematischen Toxikologische Analyse (STA) handelt es sich um das zentrale diagnostische Werkzeug für die Analyse vermuteter Vergiftungen sowohl in der Notfallmedizin als auch bei unklaren Todesfällen. Während im konkreten Verdachtsfall eine Vielzahl gut untersuchter, nachweisstarker Analysenverfahren für den gerichteten Substanznachweis zur Verfügung steht, stellt die ungerichtete Suchanalyse (General Unknown Analysis) eine besondere Herausforderung dar: die eingesetzten Analysenverfahren sollen mit vertretbarem zeitlichen und ökonomischen Aufwand eine beinahe unüberschaubare Zahl potenzieller Analyte mit hoher Selektivität und Identifikationssicherheit im relevanten Konzentrationsbereich nachweisen und nach Möglichkeit wenigstens halbquantitativ bestimmen können.

Heutzutage kommen hierfür ausschließlich Kombinationen leistungsstarker chromatographischer Trennverfahren mit hochselektiver Detektion wie die Hochleistungsflüssigchromatographie mit Photodiodenarraydetektion (HPLC-DAD), die Kapillargaschromatographie mit massensensitiver Detektion (GC-MS) und – neuerdings - auch die HPLC-MS zum Einsatz, wobei umfangreiche Datenbanken, sog. Spektrenbibliotheken, mit z. T. mehreren tausend Einträgen die Identifizierung auch solcher Verbindungen ermöglichen, die dem untersuchenden Labor als Referenz nicht zur Verfügung stehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Leistungsfähigkeit und Aussagesicherheit der HPLC-DAD im Rahmen der Systematischen Toxikologischen Analyse umfassend untersucht und bewertet. Als Messgrößen für die Substanzidentifikation standen das UV-Spektrum und die auf eine Standardsubstanz bezogene, totzeitkorrigierte relative Retentionszeit (RRT) zur Verfügung. Als Identifikationskriterium für das UV-Spektrum fand der Similarity Index (SI) Verwendung, für die RRT wurde ein sog. Fensteransatz ausgewählt.

Um eine aussagefähige Datengrundlage für die weiteren Untersuchungen zu schaffen, wurde zunächst eine in einer älteren Vorgängerversion vorliegende UV-Spektrenbibliothek mit modernen Diodenarraydetektoren vollständig neu gemessen und auf einen Substanzbestand von 2.682 UV-aktiven, toxikologisch relevanten Wirkstoffen erweitert. Die Messungen wurden im Wellenlängenbereich von 195 - 380 nm durchgeführt, die Trennung erfolgte an einer RP₈-Säule, als mobile Phasen kamen verschiedene Mischungen von Acetonitril und Phosphatpuffer pH 2,3 zum Einsatz. Neben UV-Spektren und RRT wurden in die Datenbank auch spektroskopische Daten, CAS-Nummer, Strukturformel, sowie Wirkung bzw. Verwendungszweck der untersuchten Substanzen aufgenommen. Die Spektrenbibliothek wurde als Buch und in die HPLC-Software direkt einzubindende CD-ROM einem breiten Anwenderkreis zur Verfügung gestellt. Sie stellt nach Kenntnis des Autors die weltweit größte UV-Spektrenbibliothek für den Einsatz mit der HPLC-DAD dar.

Im Zusammenhang mit allgemeinen Bestrebungen zur Einführung einheitlicher Qualitätsstandards in der forensischen Analytik wurden in der vorliegenden Arbeit die Anforderungen an eine Validierung analytisch-chemischer Messverfahren für die ungerichtete Suchanalyse sowie über die zu diesem Zweck benötigten analytisch-chemischen Kenngrößen formuliert. Als zentrale Parameter wurden hierbei Selektivität bzw. Spezifität gesehen, wobei der letztgenannte Aus-

druck auf Messgrößen, ersterer auf Analysenverfahren bezogen wurde. Des weiteren wurde eine hinreichende Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) der Mess- wie der Referenzdaten sowie eine zumindest näherungsweise Abschätzbarkeit der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen gefordert.

Zur Bestimmung der Methodenselektivität wurden zunächst Grenzwerte für die Identifikation festgelegt. Als ein auch in der Praxis bestätigter Schwellenwert für die spektrale Übereinstimmung wurde ein SI von 0,9990 gefunden, wobei bei verrauschten oder leicht überlagerten Spektren von Messung zu Messung u. U. auch niedrigere Werte anzusetzen waren. Für die RRT wurde ein Fenster von $\pm 2s$ (Standardabweichung, bezogen auf die absolute Retentionszeit) für ausreichend befunden, dies entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit im Sinne eines falsch negativen Ergebnisses von 5 %. Auf dieser Grundlage wurden sämtliche möglichen Substanzpaarungen aus der Spektrenbibliothek miteinander hinsichtlich der Übereinstimmung ihrer Messergebnisse verglichen, die Ergebnisse wurden in sog. Ähnlichkeits- bzw. Identifikationsmatrizen festgehalten. Aus diesen wurde anschließend die Zahl möglicher falsch positiver Identifizierungen durch Auszählung ermittelt. Die Berechnungen wurden zusätzlich für verschiedene Untergruppen und SI-/RRT-Schwellenwerte durchgeführt. Des weiteren wurden jeweils die Ergebnisse für die Substanzidentifikation nur auf der Basis des UV-Spektrums, nur über die RRT sowie für die Kombination beider Parameter berechnet.

Um einen Vergleich zur Selektivität anderer Analysenverfahren herstellen zu können, wurden aus der derart erhaltenen Anzahl falsch positiver Identifizierungen verschiedene in der Literatur beschriebene Kenngrößen wie die "Relative Identification Power" (RIP), die "Discriminating Power" (DP) oder die "Mean List Length" (MLL) und auch die in dieser Arbeit versuchsweise abgeleitete "mittlere Selektivität" (XM) berechnet. Schon über das UV-Spektrum alleine waren gut 60 % der 2.682 Substanzen aus der Spektrenbibliothek eindeutig identifizierbar. Mit einer MLL von 1,25 und einer DP von 0,9999 für die kombinierte Identifikation (Spektrum + RRT) sowie einem Anteil eindeutig identifizierbarer Substanzen in Höhe von 84 %, ermittelt auf der Basis von knapp 2.000 Substanzen, wurden sehr gute Resultate erzielt.

Alle Selektivitätsparameter wurden ausführlich hinsichtlich ihrer tatsächlichen Eignung für den Methodenvergleich diskutiert. Im Ergebnis wurde keine der untersuchten Kenngrößen als alleine geeignet befunden, so dass eine Zusammenschau aller Parameter als sinnvoll erachtet wurde. Aufgrund einer starken Abhängigkeit der Selektivitätsparameter von der Anzahl untersuchter Substanzen (mit Ausnahme der DP) wurde als Fazit eine nur begrenzte Vergleichbarkeit zwischen Methoden konstatiert, bei denen sich diese Anzahl stark unterschied. Insofern war auch eine Einordnung der hier erzielten Ergebnisse vor dem Hintergrund anderer in der Literatur veröffentlichter Arbeiten nur eingeschränkt möglich, da eine auch nur annähernd vergleichbar große Substanzzahl nirgendwo untersucht worden war. Die Resultate der vorliegenden Arbeit lagen jedoch trotz dieses Handicaps im Bereich der besten Literaturwerte.

Die Spezifität der RRT für die Substanzidentifikation wurde aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse bei der großen Anzahl relevanter Substanzen erwartungsgemäß als gering bewertet, wobei die Verwendung eines Gradientensystems, dessen Einsatz aus praktischen Erwägungen verworfen wurde, möglicherweise zu besseren Ergebnissen geführt

hätte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden anhand repräsentativer Testlösungen von Gemischen toxikologisch relevanter Wirkstoffe auch einige weitere Trennsäulen getestet. Lediglich eine Mischsäule mit einem Kationenaustauscheranteil wurde dabei als interessante Zusatzoption für stark polare, unter den Analysenbedingungen kationische Analyte gesehen.

Zur Untersuchung der Spezifität der UV-Spektren wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurden sämtliche im Substanzbestand der Spektrenbibliothek angetroffenen Chromophore/Absorptionssysteme erfasst und ausgezählt. Hierbei zeigte sich, dass 53,5 % der Wirkstoffe über ein einzigartiges Absorptionssystem verfügten, weitere 13,3 % enthielten ein Absorptionssystem, das nur noch ein weiteres Mal in der Spektrenbibliothek angetroffen wurde. Diese Zahlen wurden als Beleg für eine große strukturelle und damit auch spektroskopische Variabilität des betrachteten Substanzkreises gewertet.

In einem weiteren, indirekten Ansatz zur Charakterisierung der Spezifität der UV-Spektren wurde in der vorliegenden Arbeit die Anwendung der Diskriminanzanalyse zur rechnergestützten Unterscheidung zwischen ausgewählten Substanzgruppen erprobt, die nach ihrer Bedeutung in der forensisch-toxikologischen Praxis ausgewählt worden waren. Nach Kenntnis des Autors wurde bisher über die Anwendung klassifizierender Verfahren auf UV-Spektren in der Literatur nicht berichtet.

Insgesamt gingen 487 Wirkstoffe in die Untersuchungen mit ein. Im Ergebnis gelang nicht nur die Trennung zwischen den festgelegten Gruppen, es war sogar eine weitere Unterscheidung in einem hierarchischen System von Untergruppen möglich, wobei teilweise bis zu vier Hierarchieebenen erreicht wurden, bevor aufgrund der verbliebenen, geringen Substanzzahlen weitere Aussagen unmöglich wurden. Die gefundenen Resultate belegten, dass die Unterscheidung von Substanzen mit verschiedenen Absorptionssystemen über das UV-Spektrum sicher gelingt, selbst bei Verbindungen mit gleichem Absorptionssystem sind oftmals noch spektrale Unterschiede zu erkennen, die auch von nicht unmittelbar in der Nachbarschaft des Absorptionssystems befindlichen strukturellen Unterschieden herrühren können. Gleichzeitig wurden bei strukturell ähnlichen Vertretern derselben Wirkstoffklasse grundsätzlich ähnliche spektrale Verläufe gefunden, so dass auch die Zuordnung unbekannter, nicht in der Spektrenbibliothek enthaltener Substanzen anhand ihres UV-Spektrums zu einer Wirkstoffgruppe grundsätzlich möglich sein sollte.

Mess- und Methodenpräzision wurden auf der Basis exemplarischer Messungen pauschal abgeschätzt. Aufgrund der detektoreigenen Kalibrationsmöglichkeiten und von Vergleichsmessungen mit Diodenarraydetektoren verschiedener Hersteller wurde dabei das UV-Spektrum hinsichtlich seiner Lage und der relativen Intensitätsverhältnisse als fehlerfrei messbar angesehen, sofern es nicht durch den Einfluss von Rauschen bei niedrigen Konzentrationen oder durch eine Überlagerung des chromatographischen Peaks verfälscht war. Für die absoluten Retentionszeiten wurden Variationskoeffizienten $< 1\%$ (Wiederholpräzision) bzw. von $3 - 5\%$ (laborinterne Vergleichspräzision) gefunden. Über das Gesetz der Fehlerfortpflanzung wurde dann der VK für die relative Retentionszeit RRT ermittelt. Dieser fiel von extrem hohen Werten in der Nähe der Totzeit rasch ab, um sich einem Wert von etwa 5% anzunähern.

Die Präzision bei der Bestimmung der Peakflächen wurde zu etwa 1% (Wiederholpräzision)

bzw. 8 % (laborinterne Vergleichspräzision) bestimmt. Des weiteren wurden für eine Reihe von im Rahmen der STA häufig gefundener Substanzen Wiederfindungsraten bestimmt. Als im Mittel realistische Schätzung für den Fehler der Wiederfindung wurde daraus ein Wert von 10 - 20 % angenommen. Für die verschiedenen vorgestellten Probenaufbereitungsverfahren wurden für den jeweiligen Gesamtfehler bei der quantitativen Ergebnisangabe aus den Einzelfehlern Werte zwischen 8 und 15 % errechnet. Sie lagen damit im Bereich des bei Analysen aus biologischem Material üblichen und wurden als im Rahmen der STA akzeptabel angesehen.

Die pauschale Angabe von Nachweis- oder Bestimmungsgrenzen für den gesamten Substanzbestand erschien unmöglich. Neben ihrer (optimalen, aber für die STA zu aufwändigen) Ermittlung durch die Kalibriergeradenmethode scheint für die Praxis eine Abschätzung über den Signal-Rausch-Abstand (Nachweisgrenze üblicherweise dreifaches, Bestimmungsgrenze zehnfaches Grundrauschen) die praktikabelste Lösung zu sein. Dabei wurde in der vorliegenden Arbeit durch die beispielhafte Überlagerung einiger UV-Spektren mit Rauschen gezeigt, dass an der solcherart festgesetzten Bestimmungsgrenze noch mit guten SI identifiziert werden kann, während allerdings für unstrukturierte Spektren eine Identifizierung an der theoretischen Nachweisgrenze wohl nur im gezielten Verdachtsfall möglich ist.

Die vorgestellte Methode hat sich im täglichen Einsatz in der forensisch-toxikologischen Praxis gut bewährt. Ihre vielfältigen Einsatzmöglichkeiten wurden abschließend an einigen ausgewählten Vergiftungsfällen aus dem Untersuchungsgut des Instituts für Rechtsmedizin der HU Berlin demonstriert.

In der Summe erwies sich die HPLC-DAD als außerordentlich leistungsstarkes Analysenverfahren mit hoher Selektivität und Genauigkeit, das die Anforderungen der Systematischen Toxikologischen Analyse in allen wesentlichen Kriterien sehr gut erfüllte. Vergleichbar umfangreiche Arbeiten über Konkurrenzverfahren wie GC-MS oder LC-MS stehen noch aus, die dort zu erwartenden Ergebnisse dürften sich allerdings in einer ähnlichen Größenordnung bewegen, so dass von einer "einzig wahren" STA-Methode vermutlich nicht gesprochen werden kann. Ohnehin ergänzen sich die angesprochenen Verfahren hinsichtlich des zugänglichen Substanzkreises eher, als dass sie wirklich miteinander konkurrieren. Für die Zukunft der STA ist dabei die Möglichkeit der Online-Kopplung in der Kombination LC-DAD-MS als besonders interessant anzusehen.

8 LITERATUR

- [1] Carus, T. L. (1957): Über die Natur der Dinge. Aus dem Lateinischen übersetzt von Hermann Diels, Aufbau Verlag, Berlin, ISBN: 3-89853-102-3.
- [2] Brockstedt, M.; Schaefer, C.; Tetzner, M. und Weber-Nowatzki, U. (2000): Vergiftungen in Deutschland 1989 - 1999, Beratungsstelle für Vergiftungserscheinungen und Embryonaltoxikologie (Giftnotruf Berlin).
- [3] Fahron, G. und Köppel, C. (1995): Trends in der Diagnostik und Therapie von Vergiftungen, Intensivmedizin und Notfallmedizin 32 (2), Seite 86-98.
- [4] De Zeeuw, R. A. (1997): Drug screening in biological fluids. The need for a systematic approach, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 689 (1), Seite 71-79.
- [5] Maurer, H. H. (1993): Giftnachweis - Möglichkeiten und Grenzen moderner toxikologischer Analytik, Saarländisches Ärzteblatt 11, Seite 495-505.
- [6] Herzler, M.; Pragst, F.; Herre, S. und Rothe, M. (2000): Selectivity of photodiode array UV spectra for substance identification in systematic toxicological analysis, in: Lech, T., Hrsg., Problems of Forensic Sciences Special Issue: 37th TIAFT Triennial Meeting (42), Institute of Forensic Research Publishers, Kraków, Seite 122-129.
- [7] Pragst, F.; Herzler, M.; Herre, S.; Erxleben, B.-T. und Rothe, M. (2001): UV spectra of toxic compounds, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, ISBN: 3-923032-13-7.
- [8] Müller, R. K. und de Zeeuw, R. A. (1991): Systematic toxicological analysis - today and tomorrow, in: Proceedings of the 29th International Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, Copenhagen, Seite 537-544.
- [9] Müller, R. K. (1990): Aktuelle Probleme der qualitativen toxikologischen Analyse, Kriminalistik und forensische Wissenschaften (75-76), Seite 154-183.
- [10] Köppel, C. und Tenczer, J. (1995): Scope and limitations of a general unknown screening by gas chromatography-mass spectrometry in acute poisoning, Journal of the American Society for Mass Spectrometry 6 (11), Seite 995-1003.
- [11] De Zeeuw, R. A. (1998): Recent developments in analytical toxicology: for better or for worse, Toxicology Letters (102-103), Seite 103-108.
- [12] Parquet, P. J.; Bailly, D.; Deveaux, M. und Muller, P. (1988): Value of systematic toxicological analysis in the management of drug addicts, Encephale 13 (4), Seite 219-223.
- [13] Negwer, M. und Scharnow, H. G. (2001): Organic-chemical drugs and their synonyms, 8. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, ISBN: 3-527-30247-6.
- [14] Rote Liste Win 2002/1, Version 2.11, ECV Editio Cantor Verlag (2002).
- [15] Tomlin, C. D. S., Hrsg. (2000): The pesticide manual. A world compendium, 12. Auflage, The British Crop Protection Council, Farnham.
- [16] Müller, R. K. und Thieme, D. (1995): Advances versus gaps in the analysis of general unknown cases, Proceedings of the 33rd TIAFT meeting, The International Association of Forensic Toxicologists, Thessaloniki, Seite 466-471.
- [17] Müller, R. K.; Wehran, H. J.; Hunger, H. und Zschocke, D. (1992): Matrixeffektive thanatochemisch betrachtet, Beiträge zur gerichtlichen Medizin 50, Seite 121-125.
- [18] Drummer, O. H. und Gerostamoulos, J. (2002): Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects, Therapeutic Drug Monitoring 24 (2), Seite 199-209.
- [19] Müller, R. K., Grosse, J. und Thieme, D. (2000): STA and doping control - defining the relevant analytes beyond the actual doping definition, in: Rasanen, I., Hrsg., Proceedings of the 38th Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, Helsinki, Seite 150-157.
- [20] Drummer, O. H. und Kotsos, A. (1990): A class-independent drug screen in forensic toxicology using a photodiode array detector, in: Proceedings of the 27th Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, Perth, Seite 336-342.
- [21] Franke, M. H., Goenechea, S. und Baldamus, D. (1990): Rapid and effective extraction of human material, in: Proceedings of the 27th Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, Perth, Seite 274-279.
- [22] Koves, E. M. und Wells, J. (1992): Evaluation of a photodiode array/HPLC-based system for the detection and quantitation of basic drugs in postmortem blood, Journal of Forensic Sciences 37 (1), Seite 42-60.
- [23] Iten, P. X. (1993): Instrumental two-dimensional HPTLC screening for acidic and neutral drugs in whole blood and urine using solid phase extraction, Proceedings of the 31st International Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, MOLINApress, Leipzig, Seite 299-303.
- [24] Tracqui, A.; Kintz, P. und Mangin, P. (1995): Systematic toxicological analysis using HPLC/DAD, Journal of Forensic Sciences 40 (2), Seite 254-262.
- [25] Lambert, W. E.; Meyer, E. und De Leenheer, A. P. (1995): Systematic toxicological analysis of basic drugs by gradient elution of an alumina-based HPLC packing material under alkaline conditions, Journal of Analytical Toxicology 19 (2), Seite 73-78.
- [26] Lai, C.-K.; Lee, T.; Au, K.-M. und Chan, A. Y. W. (1997): Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection, Clinical Chemistry 43 (2), Seite 312-325.

- [27] Maurer, H. H. (1990): Identifizierung von Hypnotika, Anticonvulsiva und ihren Metaboliten im Urin im Rahmen eines "General-Unknown"-Analysenverfahrens mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie, in: Tagungsband 1. Gesamtdeutsches Symposium der GTFCh, Leipzig, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, Seite 106-115.
- [28] Kraemer, T., Weber, A. A. und Maurer, H. H. (1997): Improvement of sample preparation for the STA - acceleration of acid hydrolysis and derivatization procedures by microwave irradiation, in: Pragst, F., Hrsg., Tagungsband X. GTFCh-Symposium: Moderne Messverfahren im Rahmen der Toxikologisch-Forensischen Begutachtung, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, Seite 200-204.
- [29] Lo, D. S.; Chao, T. C.; Ng-Ong, S. E.; Yao, Y. J. und Koh, T. H. (1997): Acidic and neutral drugs screen in blood with quantitation using microbore high-performance liquid chromatography-diode array detection and capillary gas chromatography-flame ionization detection, *Forensic Science International* 90 (3), Seite 205-214.
- [30] Brau, M., Vanbinst, R., Hassoun, A. und Wallemacq, P. E. (1998): Simultaneous investigation and quantification of acidic and basic drugs in serum: toxicological screening by high performance liquid chromatography/diode array detector, in: Spiehler, V., Hrsg., Proceedings of the joint SOFT/TIAFT international meeting, Albuquerque, Seite 617-625.
- [31] Weinmann, W.; Metzulat, M.; Reiter, A.; Erkens, M.; Schmoldt, A.; Schütz, H.; Weller, J. P.; Magerl, H.; Erdmann, F.; von Meyer, L.; Bussemas, H.; Becker, J. und Demme, U. (1998): Extraktionsverfahren für Medikamentenwirkstoffe aus Serum für General-Unknown-Screening - Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittels, *Toxichem + Krimtech* 65 (3), Seite 112-116.
- [32] Pfleger, K.; Maurer, H. H. und Weber, A. (2000): Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, ISBN: 3-527-26989-4, 3-527-29793-6.
- [33] Boone, C. M.; Douma, J. W.; Franke, J. P.; de Zeeuw, R. A. und Ensing, K. (2001): Screening for the presence of drugs in serum and urine using different separation modes of capillary electrophoresis, *Forensic Science International* 121 (1-2), Seite 89-96.
- [34] Pragst, F.; Maurer, H. H.; Hallbach, J.; Staerk, U.; Külpmann, W. R.; Degel, F. und Gibitz, H. J. (2002): Suchverfahren (General unknown), in: Külpmann, W. R., Hrsg., Klinisch-toxikologische Analytik, Verfahren und Interpretation, Seite 49-95, Wiley-VCH, Weinheim, Seite 49-95.
- [35] Demme, U.; Becker, J.; Ahrens, B.; Bussemas, H.; Gräfe, A.; Daldup, Th.; von Meyer, L.; Padmanaban, K.; Reiter, A.; Schmidt, K.; Schmoldt, A.; Schütz, H. W. und Weinmann, W. (1998): Blindwerte bei der Serumextraktion mit Extraktionsmitteln unterschiedlicher Polarität, *Toxichem + Krimtech* 65 (1), Seite 13-17.
- [36] Lubli, G., Neri, C., Chiminazzo, S., Bonizzato, L. und Marigo, M. (1990): Solid phase extraction of whole blood samples for general unknown investigations, Proceedings of the 27th International Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, Perth, Seite 258-273.
- [37] Maurer, H. H.; Rupp, M. und Weber, A. (1991): Festphasenextraktion aus Plasma für GC und GC-MS, *Toxichem + Krimtech* 58 (4-6), Seite 91-94.
- [38] Chen, X. H.; Franke, J. P.; Wijsbeek, J. und de Zeeuw, R. A. (1992): Isolation of acidic, neutral, and basic drugs from whole blood using a single mixed-mode solid-phase extraction column, *Journal of Analytical Toxicology* 16 (6), Seite 351-355.
- [39] Bogusz, M. und Erkens, M. (1992): Festphasenextraktion von Serumproben mit Certify™-Säulen für HPLC-Screening, *Toxichem + Krimtech* 59 (1), Seite 2-10.
- [40] Chen, X. H., Franke, J. P. und de Zeeuw, R. A. (1993): A fully automated solid-phase extraction procedure for drug screening purposes in plasma and whole blood, in: Müller, R.K., Hrsg., Proceedings of the 31st International Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, MOLINApres, Leipzig, Seite 143-147.
- [41] Huang, Z., Chen, X. H., Wijsbeek, J., Franke, J. P. und de Zeeuw, R. A. (1994): An enzymatic digestion and solid-phase extraction procedure for the screening for acidic, neutral and basic drugs in liver, in: Proceedings of the 1994 Joint TIAFT/SOFT International Meeting, The International Association of Forensic Toxicologists, Tampa, Seite 102-112.
- [42] Cairns, E. R., Berezowski, R. M. und Russell, S. G. G. (1995): Screening whole blood for acidic drugs using Bond Elut Certify II and micellar elektrokinetic capillary chromatography, in: Kovatsis, A.V. und Tsoukali-Papadopolou, H., Hrsg., Proceedings of the 33rd TIAFT meeting, The International Association of Forensic Toxicologists, Thessaloniki, Seite 167-171.
- [43] Kageura, M., Hamanaka, T., Kashimura, S., Hara, K. und Hieda, Y. (1995): An evaluation of solid-phase extractions for the screening of drugs and poisons by GC-NPD, in: Kovatsis, A.V. und Tsoukali-Papadopolou, H., Hrsg., Proceedings of the 33rd TIAFT meeting, The International Association of Forensic Toxicologists, Thessaloniki, Seite 286-289.
- [44] Poletti, A., Groppi, A., Stramesi, C. und Montagna, M. (1995): Systematic toxicological analysis of drugs in whole human blood by mixed-mode solid-phase extraction, trimethylsilylation, gas chromatography-mass spectrometry, and automated detection and identification of analytes, in: Kovatsis, A.V. und Tsoukali-Papadopolou, H., Hrsg., Proceedings of the 33rd TIAFT meeting, The International Association of Forensic Toxicologists, Thessaloniki, Seite 413-423.
- [45] Poletti, A.; Groppi, A.; Vignali, C. und Montagna, M. (1998): Fully-automated systematic toxicological analysis of drugs, poisons, and metabolites in whole blood, urine, and plasma by gas chromatography-full scan mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 713 (1), Seite 265-279.
- [46] Huang, Z., Franke, J. P., Wijsbeek, J. und de Zeeuw, R. A. (1996): A single column SPE procedure for screening for a broad range of substances including more polar compounds in plasma and whole blood, in: Proceedings of the 34th TIAFT Meeting, The International Association of Forensic Toxicologists, Interlaken.
- [47] Herber, B., Hanses, A., Röhrich, J., Spahn-Langguth, H., Kauert, G. und Langguth, P. (1997): Anwendung einer Festphasenextraktionsmethode für pharmakologische und toxikologische Problemstellungen in komplexen biologischen Matrices, in: Pragst, F., Hrsg., Tagungsband X. GTFCh-Symposium: Moderne Messverfahren im Rahmen der Toxikologisch-Forensischen Begutachtung, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, Seite 226-231.
- [48] Vogt, S.; Renz, M.; Rickli, R.; Briellmann, Th. und Weinmann, W. (1997): Automatisierte Festphasenextraktion zur Extraktion von Drogen, Medikamenten und Psychopharmaka, *Toxichem + Krimtech* 64 (3), Seite 96-101.

- [49] Brady, B., Corish, J., Moane, S. und Regan, L. (1998): Automated analysis of controlled drugs in biological samples, in: Spiehler, V., Hrsg., Proceedings of the joint SOFT/TIAFT international meeting, Albuquerque, Seite 651-667.
- [50] Weinmann, W. und Svoboda, M. (1998): Fast screening for drugs of abuse by solid-phase extraction combined with flow-injection ion-spray-tandem mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 22 (4), Seite 319-328.
- [51] Weinmann, W.; Wiedemann, A.; Eppinger, B.; Renz, M. und Svoboda, M. (1999): Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 10 (10), Seite 1028-1037.
- [52] Weinmann, W., Lehmann, N., Renz, M., Wiedemann, A. und Svoboda, M. (2000): Screening for drugs in serum and urine by LC/ESI/CID-MS and MS/MS with library searching, in: Lech, T., Hrsg.: Problems of Forensic Sciences Special Issue: 37th TIAFT Triennial Meeting (42), Institute of Forensic Research Publishers, Kraków, Seite 202-208.
- [53] Stimpfl, T. und Vycudilik, W. (2000): Screening for the general unknown in tissue samples by polystyrene resins, in: Lech, T., Hrsg., Problems of Forensic Sciences Special Issue: 37th TIAFT Triennial Meeting (42), Institute of Forensic Research Publishers, Kraków, Seite 169-172.
- [54] Bogusz, M.; Maier, R.-D. und Krüger, K.-D. (1999): Anwendbarkeit der Festphasenextraktion mit absolutTM NEXUS - Kartuschen für toxikologisches Screening, *Toxichem + Krimtech* 66 (2), Seite 74-80.
- [55] Azzim, G. M. und Anderson, R. A. (2000): Extraction of acidic and basic drugs from blood using a single SPE column, in: Rasanen, I., Hrsg., Proceedings of the 38th meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, Helsinki.
- [56] Bogusz, M. J. (2000): Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 748 (1), Seite 3-19.
- [57] Korte, E. (2001): Drug screening in plasma and urine with absolutTM NEXUS. The SPE column involved in the drug discovery market and racing industry, in: Pragst, F., Hrsg., Tagungsband XII. GTFCh-Symposium in Mosbach: Toxikologische Aspekte der Sterbehilfe / Neue Drogen - chemische, analytische und toxikologische Aspekte, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, Seite 352-355.
- [58] Rittner, M.; Pragst, F.; Bork, W. R. und Neumann, J. (2001): Screening method for seventy psychoactive drugs or drug metabolites in serum based on high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 25 (2), Seite 115-124.
- [59] Chen, X. H.; Franke, J. P.; Wijsbeek, J. und de Zeeuw, R. A. (1993): Study of lot-to-lot reproducibilities of Bond Elut Certify and Clean Screen DAU mixed-mode solid-phase extraction columns in the extraction of drugs from whole blood, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 617 (1), Seite 147-151.
- [60] Franke, J. P. und de Zeeuw, R. A. (1998): Solid-phase extraction procedures in systematic toxicological analysis, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 713 (1), Seite 51-59.
- [61] Fritz, J. S. und Macka, M. (2000): Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis, *Journal of Chromatography A* 902 (1), Seite 137-166.
- [62] Drummer, O. H. (1999): Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 733 (1-2), Seite 27-45.
- [63] Maurer, H. H. (1992): Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography* 580 (1-2), Seite 3-41.
- [64] Maurer, H. H. (1999): Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 733 (1-2), Seite 3-25.
- [65] Poletini, A. (1999): Systematic toxicological analysis of drugs and poisons in biosamples by hyphenated chromatographic and spectroscopic techniques, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 733 (1-2), Seite 47-63.
- [66] Müller, R. K., Hrsg. (1991): Toxicological analysis, Verlag Gesundheit, Berlin, ISBN: 3-333-00634-0.
- [67] Wilhelm, D. (2001): Möglichkeiten der Bestimmung von endogenen und exogenen Analyten aus biologischer Matrix mit HPLC nach online-Probenvorbereitung, Abschlussarbeit für das Postgradualstudium Toxikologie an der Universität Leipzig.
- [68] N. N. (1997): LiChrospher ADS. Direkte Analytik kleiner Moleküle in biologischen Proben. Fa. Merck, Darmstadt.
- [69] Vielhauer, S.; Rudolphi, A.; Boos, K. S. und Seidel, D. (1995): Evaluation and routine application of the novel restricted-access precolumn packing material alkyl-diol silica: coupled-column high-performance liquid chromatographic analysis of the photoreactive drug 8-methoxypsoralen in plasma, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 666 (2), Seite 315-322.
- [70] Yu, Z. und Westerlund, D. (1996): Direct injection of large volumes of plasma in a column-switching system for the analysis of local anaesthetics I. Optimization of semi-permeable surface precolumns in the system and characterization of some interference peaks, *Journal of Chromatography A* 725 (1), Seite 137-147.
- [71] Yu, Z. und Westerlund, D. (1996): Direct injection of large volumes of plasma in a column-switching system for the analysis of local anaesthetics. II. Determination of bupivacaine in human plasma with an alkyl-diol silica precolumn, *Journal of Chromatography A* 725 (1), Seite 149-155.
- [72] Yu, Z.; Westerlund, D. und Boos, K. S. (1997): Determination of methotrexate and its metabolite 7-hydroxymethotrexate by direct injection of human plasma into a column-switching liquid chromatographic system using post-column photochemical reaction with fluorimetric detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 689 (2), Seite 379-386.
- [73] Yu, Z. und Westerlund, D. (1996): Ion-pair chromatography of methotrexate in a column-switching system using an alkyl-diol silica precolumn for direct injection of plasma, *Journal of Chromatography A* 742 (1-2), Seite 113-120.

- [74] Oertel, R.; Richter, K.; Gramatte, T. und Kirch, W. (1998): Determination of drugs in biological fluids by high-performance liquid chromatography with on-line sample processing, *Journal of Chromatography A* 797 (1-2), Seite 203-209.
- [75] Kubalec, P. und Brandsteterova, E. (1999): Determination of propafenone and its main metabolite 5-hydroxypropafenone in human serum with direct injection into a column-switching chromatographic system, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 726 (1-2), Seite 211-218.
- [76] Baeyens, W. R.; Van der Weken, G.; Haustraete, J.; Aboul-Enein, H. Y.; Corveleyn, S.; Remon, J. P.; Garcia-Campana, A. M. und Deprez, P. (2000): Application of the restricted-access precolumn packing material alkyl-diol silica in a column-switching system for the determination of ketoprofen enantiomers in horse plasma, *Journal of Chromatography A* 871 (1-2), Seite 153-161.
- [77] Lamprecht, G.; Kraushofer, T.; Stoschitzky, K. und Lindner, W. (2000): Enantioselective analysis of (R)- and (S)-atenolol in urine samples by a high-performance liquid chromatography column-switching setup, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 740 (2), Seite 219-226.
- [78] Gordi, T.; Nielsen, E.; Yu, Z.; Westerlund, D. und Ashton, M. (2000): Direct analysis of artemisinin in plasma and saliva using coupled-column high-performance liquid chromatography with a restricted-access material pre-column, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 742 (1), Seite 155-162.
- [79] Mislanova, C. und Hutta, M. (2001): Influence of various biological matrices (plasma, blood microdialysate) on chromatographic performance in the determination of β -blockers using an alkyl-diol silica precolumn for sample clean-up, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 765 (2), Seite 167-177.
- [80] El Mahjoub, A. und Staub, C. (2001): High-performance liquid chromatography determination of flunitrazepam and its metabolites in plasma by use of column-switching technique: Comparison of two extraction columns, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 754 (2), Seite 271-283.
- [81] Hogendoorn, E. A.; van Zoonen, P.; Poletini, A.; Bouland, G. M. und Montagna, M. (1998): The potential of restricted access media columns as applied in coupled-column LC/LC-TSP/MS/MS for the high-speed determination of target compounds in serum. application to the direct trace analysis of salbutamol and clenbuterol, *Analytical Chemistry* 70, Seite 1362-1368.
- [82] El Mahjoub, A. und Staub, C. (2000): High-performance liquid chromatographic method for the determination of benzodiazepines in plasma or serum using the column-switching technique, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 742 (2), Seite 381-390.
- [83] Öhman, D.; Carlsson, B. und Norlander, B. (2001): On-line extraction using an alkyl-diol silica precolumn for racemic citalopram and its metabolites in plasma. Results compared with solid-phase extraction methodology, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 753 (2), Seite 365-373.
- [84] Friedrich, G.; Rose, T. und Rissler, K. (2002): Determination of lonazac and its hydroxy and O-sulfated metabolites by on-line sample preparation liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 766 (2), Seite 295-305.
- [85] Boos, K.-S. und Rudolphi, A. (1998): The use of restricted access media in HPLC, part I - classification and review, *LC-GC International* 11 (2), Seite 84-95.
- [86] Yu, Z.; Westerlund, D. und Boos, K. S. (1997): Evaluation of liquid chromatographic behavior of restricted-access media precolumns in the course of direct injection of large volumes of plasma samples in column-switching systems, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 704 (1-2), Seite 53-62.
- [87] Boos, K. S. und Fleischer, C. T. (2001): Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP), *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 371 (1), Seite 16-20.
- [88] El Mahjoub, A. und Staub, C. (2001): Determination of benzodiazepines in human hair by on-line high-performance liquid chromatography using a restricted access extraction column, *Forensic Science International* 123 (1), Seite 17-25.
- [89] Gill, R.; Law, B.; Brown, C. und Moffat, A. C. (1985): A computer search system for the identification of drugs using a combination of thin-layer chromatographic, gas-liquid chromatographic and ultraviolet spectroscopic data, *Analyst* 110 (9), Seite 1059-1065.
- [90] Moffat, A. C.; Smalldon, K. W. und Brown, C. (1974): Optimum use of paper, thin-layer and gas-liquid chromatography for the identification of basic drugs I. Determination of effectiveness for a series of chromatographic systems, *Journal of Chromatography* 90, Seite 1-7.
- [91] Moffat, A. C. und Smalldon, K. W. (1974): Optimum use of paper, thin-layer and gas-liquid chromatography for the identification of basic drugs II. Paper and thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography* 90, Seite 9-17.
- [92] Binder, S. R.; Regalia, M. und Sivorinovsky, G. (1989): Toxicological screening by liquid chromatography, *Trends in Analytical Chemistry* 8 (10), Seite 362-367.
- [93] Demme, U.; Ahrens, B.; Klein, A. und Werner, R. (2000): The combination of two-dimensional thin layer chromatography and remission spectrometry - a chromatographic technique with high identification power for systematic toxicological analysis, in: Lech, T., Hrsg., *Problems of Forensic Sciences Special Issue: 37th TIAFT Triennial Meeting* (42), Institute of Forensic Research Publishers, Kraków, Seite 65-74.
- [94] Moffat, A. C.; Franke, J. P.; Stead, A. H.; Gill, R.; Finkle, B. S.; Möller, M. R.; Müller, R. K.; Wunsch, F. und de Zeeuw, R. A. (1987): Thin-layer chromatographic R_f values of toxicologically relevant substances on standardized systems, VCH, Weinheim, ISBN: 3-527-27361-1.
- [95] Ahrens, B.; Blankenhorn, D. und Spangenberg, B. (2002): Advanced fibre optical scanning in thin-layer chromatography for drug identification, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 772 (1), Seite 11-18.

- [96] Maurer, H. H. und Arlt, J. W. (1999): Screening procedure for detection of dihydropyridine calcium channel blocker metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic compounds by gas chromatography-mass spectrometry after extractive methylation, *Journal of Analytical Toxicology* 23 (2), Seite 73-80.
- [97] Maurer, H. H. und Bickerboeller-Friedrich, J. (2000): Screening procedure for detection of antidepressants of the selective serotonin reuptake inhibitor type and their metabolites in urine as part of a modified systematic toxicological analysis procedure using gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 24 (5), Seite 340-347.
- [98] Turcant, A.; Premel-Cabic, A.; Cailleux, A. und Allain, P. (1991): Toxicological screening of drugs by microbore high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection and ultraviolet spectral library searches, *Clinical Chemistry* 37 (7), Seite 1210-1215.
- [99] Pragst, F.; Erxleben, B.-T.; Herre, S. und Aberger, K. (1994): HPLC in der systematischen toxikologischen Analyse, *GIT Spezial - Chromatographie* (2), Seite 92-96.
- [100] Maier, R. D. und Bogusz, M. (1995): Identification power of a standardized HPLC-DAD system for systematic toxicological analysis, *Journal of Analytical Toxicology* 19 (2), Seite 79-83.
- [101] Kovacs, E. M. (1995): Use of high-performance liquid chromatography-diode array detection in forensic toxicology, *Journal of Chromatography A* 692 (1-2), Seite 103-119.
- [102] Lambert, W. E.; Van Bocxlaer, J. F. und De Leenheer, A. P. (1997): Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 689 (1), Seite 45-53.
- [103] Kohn, A. (1993): Arzneistoff-Screening in der Toxikologie mittels vollautomatisierter HPLC, Dioden-Array Detektion und UV-Spektrenbibliotheksvergleich, *Toxichem + Krimtech* 60 (2), Seite 39-50.
- [104] Kalasinsky, K. S.; Schaefer, T. und Binder, S. R. (1995): Forensic application of an automated drug-profiling system, *Journal of Analytical Toxicology* 19 (6), Seite 412-418.
- [105] Felscher, D. und Schulz, K. (2000): Screening of amphetamine/methamphetamine and their derivatives in urine using FPIA and Triage 8 and the scope and limits of a subsequent identification by means of the REMEDI HS system, *Journal of Forensic Sciences* 45 (6), Seite 1327-1331.
- [106] Valli, A.; Poletti, A.; Papa, P. und Montagna, M. (2001): Comprehensive drug screening by integrated use of gas chromatography/mass spectrometry and Remedi HS, *Therapeutic Drug Monitoring* 23 (3), Seite 287-294.
- [107] De Zeeuw, R. A. (1989): Modern chromatographic procedures in systematic toxicological analysis, *Journal of Chromatography* 488 (1), Seite 199-213.
- [108] De Zeeuw, R. A.; Hartstra, J. und Franke, J. P. (1994): Potential and pitfalls of chromatographic techniques and detection modes in substance identification for systematic toxicological analysis, *Journal of Chromatography A* 674, Seite 3-13.
- [109] Bogusz, M. (1999): Hyphenated liquid chromatographic techniques in forensic toxicology, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 733 (1-2), Seite 65-91.
- [110] Moeller, M. R.; Steinmeyer, S. und Kraemer, T. (1998): Determination of drugs of abuse in blood, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 713 (1), Seite 91- 109.
- [111] Marquet, P. und Lachatre, G. (1999): Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 733 (1-2), Seite 93-118.
- [112] Lips, A. G. A. M.; Lameijer, W.; Fokkens, R. H. und Nibbering, N. M. M. (2001): Methodology for the development of a drug library based upon collision-induced fragmentation for the identification of toxicologically relevant drugs in plasma samples, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 759 (2), Seite 191-207.
- [113] Sauber, C. and Mandel, F. (2001): Rapid identification of drugs in biological matrices with LC/MS Iontrap and a spectral library, in: Pragst, F., Hrsg.: Tagungsband XII. GTFCh-Symposium in Mosbach: Toxikologische Aspekte der Sterbehilfe / Neue Drogen - chemische, analytische und toxikologische Aspekte, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim.
- [114] Müller, C.; Schäfer, P.; Störtzel, M.; Vogt, S. und Weinmann, W. (2002): Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 773 (1), Seite 47-52.
- [115] Stimpfl, T. und Vycudilik, W. (2000): Identification of the general unknown. Application of mass selective detectors in forensic toxicology, *Journal of Analytical Toxicology* 24 (1), Seite 32-36.
- [116] Thieme, D., Große, J., Lang, R., Müller, R. K. und Wahl, A. (2001): Möglichkeiten und Grenzen der Anwendung von LC-ESI-MS-MS im Screening toxikologisch relevanter Substanzen, in: Pragst, F., Hrsg., Tagungsband XII. GTFCh-Symposium in Mosbach: Toxikologische Aspekte der Sterbehilfe / Neue Drogen - chemische, analytische und toxikologische Aspekte, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, Seite 66-71.
- [117] Boone, C. M.; Franke, J. P.; de Zeeuw, R. A. und Ensing, K. (2000): Intra- and interinstrument reproducibility of migration parameters in capillary electrophoresis for substance identification in systematic toxicological analysis, *Electrophoresis* 21 (8), Seite 1545-1551.
- [118] Boone, C. M.; Franke, J. P.; de Zeeuw, R. A. und Ensing, K. (1999): Evaluation of capillary electrophoretic techniques towards systematic toxicological analysis, *Journal of Chromatography A* 838 (1-2), Seite 259-272.
- [119] Boone, C. M.; Manetto, G.; Tagliaro, F.; Waterval, J. C.; Underberg, W. J.; Franke, J. P.; de Zeeuw, R. A. und Ensing, K. (2002): Interlaboratory reproducibility of mobility parameters in capillary electrophoresis for substance identification in systematic toxicological analysis, *Electrophoresis* 23 (1), Seite 67-73.

- [120] Brady, P. H. (1993): The application of a data base package to xenobiotic identification, in: Müller, R. K., Hrsg., Proceedings of the 31st International Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, MOLINApres, Leipzig, Seite 108-112.
- [121] Balikova, M. (1993): Application of HPLC with photodiode array detection for systematic toxicological analyses of drug groups, in: Müller, R. K., Hrsg., Proceedings of the 31st International Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, MOLINApres, Leipzig, Seite 29-33.
- [122] Bogusz, M. und Erkens, M. (1994): Reversed-phase high-performance liquid chromatographic database of retention indices and UV spectra of toxicologically relevant substances and its interlaboratory use, *Journal of Chromatography A* 674 (1-2), Seite 97-126.
- [123] Gaillard, Y. und Pepin, G. (1997): Use of high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection for the creation of a 600-compound library. Application to forensic toxicology, *Journal of Chromatography A* 763 (1-2), Seite 149-163.
- [124] Marquet, P.; Venisse, N.; Lacassie, E. und Lachatre, G. (2001): In-source CID mass spectral libraries for the "general unknown" screening of drugs and toxicants, *Analisis* 28 (10), Seite 925-934.
- [125] Aced, G. und Möckel, H. J. (1991): *Liquidchromatographie*, 1. Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, ISBN: 3-527-28195-9.
- [126] Meyer, V. (1999): *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 8. überarb. Auflage, Salle, Frankfurt am Main, Aarau, ISBN: 3-7935-5452-X.
- [127] Pragst, F., Erxleben, B.-T., and Herre, S. (1993): Qualitative Zusammenhänge zwischen Struktur und Retentionszeit organischer Wirkstoffe bei der HPLC an RP-Phasen mit saurer mobiler Phase, in: Sachs, H., Hrsg., Tagungsband GTFCh-Symposium Drogenkontrolle in der heutigen Gesellschaft / Forensische Chemie, Verlag Dieter Helm, Heppenheim, Seite 135-144.
- [128] Herre, S. und Pragst, F. (1997): Shift of the high-performance liquid chromatographic retention times of metabolites in relation to the original drug on an RP8 column with acidic mobile phase, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 692 (1), Seite 111-126.
- [129] Hesse, M.; Meier, H. und Zeeh, B. (1991): *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 4. überarb. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, ISBN: 3-13-576104-5.
- [130] Atkins, P. W. (1988): *Physikalische Chemie*, Korr. 1. Auflage, VCH, Weinheim, ISBN: 3-527-25913-9.
- [131] Skoog, D. A. und Leary, J. J. (1996): *Instrumentelle Analytik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, ISBN: 3-540-60450-2.
- [132] Staab, H. A. (1962): Die Lichtabsorption im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich, in: Einführung in die theoretische organische Chemie, 3. ergänzte Auflage, Auflage, Verlag Chemie, Weinheim, Seite 292-419.
- [133] Perkampus, H.-H. (1992): *UV-VIS atlas of organic compounds*, 2. Auflage, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, ISBN: 3-527-28510-5.
- [134] Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W. und Starke, K. (1996): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 7., völlig neu bearbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, ISBN: 3-8274-0088-0.
- [135] Tipler, P. A. (1995): *Physik*, korr. Nachdruck der 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, ISBN: 3-86025-122-8.
- [136] George, S. A. (1993): Historical developments / Modern Developments, in: Huber, L. und George, S. A., Hrsg., Diode Array Detection in HPLC, *Chromatographic Science Series* (62), Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, Seite 127.
- [137] N. N. (1995): UV/VIS photodiode array detector SPD-M10Avp, User's manual, Shimadzu Corporation. Analytical Instruments Division., Kyoto.
- [138] Bogusz, M.; Franke, J. P.; de Zeeuw, R. A. und Erkens, M. (1993): An overview on the standardization of chromatographic methods for screening analysis in toxicology by means of retention indices and secondary standards. Part II. High performance liquid chromatography, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 347 (3-4), Seite 73-81.
- [139] Bronstein, I. N. und Semendjajew, K. A. (1987): *Taschenbuch der Mathematik*, BSB B.G. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig, ISBN: 3-322-00259-4.
- [140] Akkerboom, J. C.; Schepers, P. G. und van der Werff, J. (1980): Thin layer chromatography, a case study, *Statistica Neerlandica* 34, Seite 173-187.
- [141] Hartstra, J.; Franke, J. P. und de Zeeuw, R. A. (2000): How to approach substance identification in qualitative bioanalysis, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 739 (1), Seite 125-137.
- [142] Demme, U., Ahrens, B., Klein, A., and Werner, R. (2000): Discriminating power nearly one - ion-trap GC-MS as an ideal tool for STA, in: Rasanen, I., Hrsg., Proceedings of the 38th Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, Helsinki, Seite 19-26.
- [143] Hartstra, J., Franke, J. P., and de Zeeuw, R. A. (1993): How to incorporate diode array spectra in computerized data bases in analytical toxicology. Comparison of the correlation coefficient and the vector-based fit parameter, in: Müller, R. K., Hrsg., Proceedings of the 31st International Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists, MOLINApres, Leipzig, Seite 271-275.
- [144] Otto, M. (1997): *Chemometrie. Statistik und Computereinsatz in der Analytik*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, ISBN: 3-527-28849-X.
- [145] Sievert, H.-J. P. und Drouen, A. C. J. H (1993): Spectral matching and peak purity, in: Huber, L. und George, S. A., Hrsg., Diode Array Detection in HPLC, *Chromatographic Science Series* (62), Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, Seite 51-126.

- [146] Rösener, H.-U. (1996): Entwurf einer Grundsatz-Erklärung zu Qualitätsmanagement und Akkreditierung in den Forensischen Wissenschaften / Entwurf zum Aufbau eines Qualitätsmanagement-Systems und zur Vorbereitung einer eventuellen Akkreditierung in den Forensischen Wissenschaften, Toxichem + Krimtech 63 (2), Seite 52-62.
- [147] Peters, F. T. und Maurer, H. H. (2001): Review: Bioanalytical method validation - How, how much and why ?, Toxichem + Krimtech 68 (3), Seite 116-126.
- [148] Hartung, M., Holz, W. und Latza, R. (2001): Qualitätsmanagementsysteme im analytischen Labor - Bürokratischer Ballast oder effizientes Werkzeug?, in: Pragst, F., Hrsg., XII. GTFCh-Symposium in Mosbach: Toxikologische Aspekte der Sterbehilfe / Neue Drogen - chemische, analytische und toxikologische Aspekte, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, Seite 235-241.
- [149] Herbold, M., Schmitt, G. und Aderjan, R. (1999): Optimierte Kalibratorkonzentrationen zur vergleichbaren Berechnung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze bei der THC-Analyse aus Serum, in: Pragst, F., Hrsg., XI. GTFCh-Symposium Mosbach: Nachweis berauschender Mittel im Straßenverkehr / Forensische Aspekte der toxischen Präparation von Lebensmitteln, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, Seite 15-20.
- [150] Mußhoff, F.; Daldrup, Th.; Herbold, M. und von Meyer, L. (2000): Anlagen zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Anhang B: Qualitätsstandards für spezielle Analyten, Toxichem + Krimtech 67 (3), Seite 91-93.
- [151] Aderjan, R.; Babel, B.; Briellmann, T.; Daldrup, Th.; Demme, U.; Hallbach, J.; Hartung, M.; Harzer, K.; Herbold, M.; von Meyer, L.; Möller, M.; Mußhoff, F.; Weinmann, W. und Schmitt, G. (2000): Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Anhang A: Anforderung an einzelne Analysemethoden, Toxichem + Krimtech 67 (1), Seite 13-16.
- [152] Herbold, M. und Schmitt, G. (1998): Qualitätsansprüche an die quantitative MS-Untersuchung, Toxichem + Krimtech 65 (3), Seite 87-96.
- [153] Aderjan, R.; Briellmann, T.; Daldrup, Th.; Demme, U.; Harzer, K.; Herbold, M.; Käferstein, H.; Kauert, G.; von Meyer, L.; Möller, M.; Mußhoff, F.; Schmitt, G. und Weinmann, W. (1998): Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Toxichem + Krimtech 65 (1), Seite 18-24.
- [154] N. N. (1997/1999): OECD-Grundsätze der Guten Laborpraxis (Neufassung aus 1997), Umweltdirektorat der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- [155] N. N. (1994): Q2a, Text on validation of analytical procedures, ICH Tripartite Guideline, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, <http://www.ich.org> (18.10.2002).
- [156] N. N. (1994): Q2b, Validation of analytical procedures: methodology, ICH Tripartite Guideline, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, <http://www.ich.org> (18.10.2002).
- [157] Kromidas, S. (1999): Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, ISBN: 3-527-28748-5.
- [158] Shah, V. P.; Midha, K. K.; Findlay, J. W.; Hill, H. M.; Hulse, J. D.; McGilveray, I. J.; McKay, G.; Miller, K. J.; Patnaik, R. N.; Powell, M. L.; Tonelli, A.; Viswanathan, C. T. und Yacobi, A. (2000): Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress, Pharmaceutical Research 17 (12), Seite 1551-1557.
- [159] Kaiser, H. (1972): Zur Definition von Selektivität, Spezifität und Empfindlichkeit von Analysenverfahren, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 260, Seite 252-260.
- [160] Arbeitsausschuss Chemische Terminologie (AChT) im DIN (Deutsches Institut für Normung) (1994): DIN 32645 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Ermittlung unter Wiederholbedingungen. Begriffe, Verfahren, Auswertung, Beuth Verlag, Berlin, Wien, Zürich.
- [161] Huber, W. (2001): Modifikation von DIN 32645 zur Bestimmung der Nachweis- und Erfassungsgrenze, GIT Labor-Fachzeitschrift (12), Seite 1308-1309.
- [162] Boque, R. und Rius, F. X. (1996): Multivariate detection limits estimators, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 32 (1), Seite 11-23.
- [163] Eckschlager, K. und Štěpánek, V. (1979): Information theory as applied to chemical analysis, in: Elving, P. E., Winefordner, J. D., Hrsg., Chemical Analysis. A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications (53), John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, ISBN: 0-471-04945-X.
- [164] Eckschlager, K. (1975): Informationsgehalt analytischer Ergebnisse, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 277, Seite 1-8.
- [165] Eckschlager, K. und Danzer, K. (1994): Information theory in analytical chemistry, in: Winefordner, J. D., Hrsg., Chemical Analysis. A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications (128), John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, ISBN: 0-471-59507-1.
- [166] Thieme, D. und Müller, R. K. (1997): Information theory and systematic toxicological analysis in "general unknown" poisoning cases, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 358 (7/8), Seite 785-792.
- [167] Matherny, M. und Eckschlager, K. (1996): Determination of relevancy and redundancy of the parameters of information theory, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 32 (1), Seite 67-72.
- [168] Danzer, K.; Florian, K.; Hassler, J.; Matherny, M.; Schroen, W. und Zaray, G. (1998): Comparison of solid sampling spectrochemical methods by means of multivariate statistics and information theory, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 13 (5), Seite 371-375.
- [169] Huber, J. F. K.; Kenndler, E.; Reich, G.; Hack, W. und Wolf, J. (1993): Optimal selection of gas chromatographic columns for the analytical control of chemical warfare agents by application of information theory to retention data, Analytical Chemistry 65, Seite 2903-2906.

- [170] Matsuda, R.; Hayashi, Y.; Suzuki, T. und Saito, Y. (1993): Information theory of miniaturization advantages of column liquid chromatography for quantitative analysis, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 347, Seite 225-229.
- [171] Müller, R. K. and Thieme, D. (1992): Systematic toxicological analysis and information theory, in: *Proceedings of the 30th International Meeting of TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists*, Fukuoka, Seite 223-227.
- [172] Schepers, P. G.; Franke, J. P. und de Zeeuw, R. A. (1983): System evaluation and substance identification in systematic toxicological analysis by the mean list length approach, *Journal of Analytical Toxicology* 7 (6), Seite 272-278.
- [173] Franke, J. P.; de Zeeuw, R. A. und Schepers, P. G. (1985): Retrieval of analytical data and substance identification in systematic toxicological analysis by the mean list length approach, *Journal of Forensic Sciences* 30 (4), Seite 1074-1081.
- [174] Lewi, P. J. (1995): Pattern recognition, reflections from a chemometric point of view, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 28 (1), Seite 23-33.
- [175] Christie, O. H. J. (1995): Introduction to multivariate methodology, an alternative way?, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 29 (2), Seite 177-188.
- [176] Brereton, R. G. (1990): *Chemometrics. Applications of mathematics and statistics to laboratory systems*, 1. Auflage, Ellis Horwood, New York, London, Toronto, Sydney, Tokio, Singapur, ISBN: 0-13-131350-9.
- [177] Brereton, R. G.; Lewi, P. J.; Bratchell, N.; Deane, J. M.; Karstang, T. V.; Coomans, D.; Massart, D. L. und Kvalheim, O. M. (1992): Multivariate pattern recognition in chemometrics, 1. Auflage, in: Brereton, R. G., Vandeginste, B. G. M. und Kvalheim, O. M., Hrsg., *Data Handling in Science and Technology* (9), Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokio, ISBN: 0-444-89784-4.
- [178] Gemperline, P. J. und Hamilton, J. C. (1990): Factor analysis of spectro-chromatographic data, in: Meuzelaar, H. M. C., Hrsg., *Computer-enhanced analytical spectroscopy* (2), Plenum Publishing Corporation, New York.
- [179] De Maesschalck, R.; Jouan-Rimbaud, D. und Massart, D. L. (2000): The Mahalanobis distance, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 50 (1), Seite 1-18.
- [180] Wu, W. und Massart, D. L. (1997): Regularised nearest neighbour classification method for pattern recognition of near infrared spectra, *Analytica Chimica Acta* 349 (1-3), Seite 253-261.
- [181] Backhaus, K.; Erichson, B.; Plinke, W. und Weiber, R. (1996): *Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung*, 8., verb. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- [182] Szczubialka, K.; Verdu-Andres, J. und Massart, D. L. (1998): A new method of detecting clustering in the data, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 41 (2), Seite 145-160.
- [183] Mallet, Y.; Coomans, D. und de Vel, O. (1996): Recent developments in discriminant analysis on high dimensional spectral data, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 35 (2), Seite 157-173.
- [184] Andersson, P. L.; Haglund, P. und Tysklind, M. (1997): Ultraviolet absorption spectra of all 209 polychlorinated biphenyls evaluated by principal component analysis, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 357 (8), Seite 1088-1092.
- [185] Detroyer, A.; Schoonjans, V.; Questier, F.; Van der Heyden, Y.; Borosy, A. P.; Guo, Q. und Massart, D. L. (2000): Exploratory chemometric analysis of the classification of pharmaceutical substances based on chromatographic data, *Journal of Chromatography A* 897 (1-2), Seite 23-36.
- [186] Dirinck, I.; Praisler, M.; Van Bocxlaer, J. F.; De Leenheer, A., and Massart, D. L. (2000): Comparison between automated knowledge-based systems identifying and classifying amphetamine analogues using vapor-phase FTIR spectra and mass spectra, in: Lech, T., Hrsg., *Proceedings of the 37th International Meeting of TIAFT, Institute of Forensic Research Publishers, Kraków*, Seite 62-69.
- [187] Praisler, M.; Dirinck, I.; Lambert, W.; De Leenheer, A., and Massart, D. L. (2000): Evaluation of sample preparation techniques adequate for multivariate algorithms applied for the identification and classification of amphetamine analogues with GC-FTIR, in: Lech, T., *Proceedings of the 37th International Meeting of TIAFT, Institute of Forensic Research Institute Publishers, Kraków*, Seite 200-207.
- [188] Giacomelli, L.; Boggetti, H.; Agnelli, H.; Cattana, R. und Silber, J. J. (1999): Factor analysis applied to the study of retention mechanism of nitroanilines in normal phase high performance liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta* 402 (1-2), Seite 285-295.
- [189] Romano, G.; Caruso, G.; Musumarra, G.; Pavone, D. und Cruciani, G. (1994): Qualitative organic analysis. Part 3. Identification of drugs and their metabolites by PCA of standardized TLC data, *Journal of Planar Chromatography* 7, Seite 233-241.
- [190] Schoonjans, V.; Questier, F.; Guo, Q.; Van der Heyden, Y. und Massart, D. L. (2001): Assessing molecular similarity/diversity of chemical structures by FT-IR spectroscopy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24 (4), Seite 613-627.
- [191] Moss, W. W.; Posey, F. T. und Peterson, P. C. (1980): A multivariate analysis of the infrared spectra of drugs of abuse, *Journal of Forensic Sciences* 25 (2), Seite 304-313.
- [192] Sondermann, N. und Kovar, K. A. (1999): Screening experiments of ecstasy street samples using near infrared spectroscopy, *Forensic Science International* 106 (3), Seite 147-156.
- [193] Dams, R.; Benijts, T.; Lambert, W. E.; Massart, D. L. und De Leenheer, A. P. (2001): Heroin impurity profiling: trends throughout a decade of experimenting, *Forensic Science International* 123 (2-3), Seite 81-88.
- [194] Brody, R. H.; Edwards, H. G. M. und Pollard, A. M. (2000): Chemometric methods applied to the differentiation of Fourier-transform Raman spectra of ivories, *Analytica Chimica Acta* 427 (2), Seite 223-232.
- [195] Kemsley, E. K. (1996): Discriminant analysis of high-dimensional data: a comparison of principal components analysis and partial least squares data reduction methods, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 33 (1), Seite 47- 61.
- [196] Park, Y. J.; Kim, K. R. und Kim, J. H. (1999): Gas chromatographic organic acid profiling analysis of brandies and whiskeys for pattern recognition analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (6), Seite 2322-2326.

- [197] Peres, C.; Viallon, C. und Berdague, J. L. (2001): Solid-phase microextraction-mass spectrometry: a new approach to the rapid characterization of cheeses, *Analytical Chemistry* 73 (5), Seite 1030-1036.
- [198] Salvatore, F.; Sacchetti, L. und Castaldo, G. (1997): Multivariate discriminant analysis of biochemical parameters for the differentiation of clinically confounding liver diseases, *Clinica Chimica Acta* 257 (1), Seite 41-58.
- [199] Strasters, J. K. (1993): Chemometrics and photodiode array detection, in: Huber, L. und George, S. A. Hrsg., *Diode Array Detection in HPLC*, Chromatographic Science Series (62), Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, Seite 127-162.
- [200] Sanchez, F. C.; Rutan, S. C.; Garcia, M. D. G. und Massart, D. L. (1997): Resolution of multicomponent overlapped peaks by the orthogonal projection approach, evolving factor analysis and window factor analysis, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 36 (2), Seite 153-164.
- [201] Varotsis, N.; Pasadakis, N. und Gaganis, V. (1998): A novel approach for the characterization of aromatics in petroleum fractions using HPLC-UV-DAD and evolving factor analysis, *Fuel* 77 (13), Seite 1495-1502.
- [202] Meinrath, G. und Lis, S. (2001): Quantitative resolution of spectroscopic systems using computer-assisted target factor analysis (CAT), *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 369 (2), Seite 124-133.
- [203] Xu, C. J.; Liang, Y. Z.; Gong, F. und Cui, H. (2001): Incorporating the prior information of spectra into identification of elution region in hyphenated chromatography, *Analytica Chimica Acta* 428 (2), Seite 235-244.
- [204] Balcerowska, G. und Siuda, R. (1999): On the application of principal component analysis and factor analysis in electron spectroscopy: the limit of detectability of factors in a set of noisy spectra, *Applied Surface Science* 144-145, Seite 83-87.
- [205] Pragst, F.; Herzler, M. und Herre, S. (2000): Use of high performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-DAD) in clinical toxicology, *Clinical Biochemistry and Metabolism* (1), Seite 13- 16.
- [206] Regenthal, R.; Krüger, M.; Köppel, C. und Preiß, R. (1999): Zu Möglichkeiten und Grenzen von therapeutischen und klinisch-toxikologischen Referenzwerten für Plasma-/Serum-/Vollblutkonzentrationen von Arzneimitteln bei akuten Vergiftungen - eine Übersicht, *Anästhesiologie & Intensivmedizin* 3 (40), Seite 129-144.
- [207] Schulz, M. und Schmoldt, A. (1997): Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 500 drugs, *Pharmazie* 52 (12), Seite 895-911.
- [208] N. N. (2002): Pharmazeutische Stoffliste, 13. Auflage, ABDATA Pharma-Daten-Service, Eschborn/Taunus.
- [209] N. N. (1999): Römpp Chemielexikon CD-ROM, Version 2.0, 10. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [210] N. N. (1999): Microsoft Access 2000, Microsoft Corp., Seattle.
- [211] N. N. (2000): Isis Draw, Version 2.3, MDL Information Systems, Inc., San Leandro.
- [212] N. N. (1997): Isis Base, Version 2.1.2, MDL Information Systems, Inc., San Leandro.
- [213] N. N. (1999): Microsoft Excel 2000, Version 9.0.2812, Microsoft Corp., Seattle.
- [214] N. N. (2000): SPSS für Windows, Version 10.0.7, SPSS Inc., Chicago.
- [215] N. N. (1999): MatLab, Version 5.3.0.10183 (R11), The MathWorks. Inc., Natick.
- [216] Heller, C. (2001): Von der Datenbank zur (spektroskopischen) Werkbank, *Toxichem + Krimtech* 68 (3), Seite 132-135.
- [217] Williams, A.; Kolovanov, E. und Hofmann, H. (2000): Chromatographie-Daten-System mit integriertem Molekülstruktur-Management, *GIT Labor-Fachzeitschrift* (2), Seite 154-157.
- [218] Mußhoff, F. (1999): Verhältnisse der Massenfragmente bei GC/MS-Analysen auf Drogen - Ergebnisse einer Umfrage, *Toxichem + Krimtech* 66 (2), Seite 98- 99.
- [219] Chen, Y.; Kele, M.; Tuinman, A. A. und Guiochon, G. (2000): Comparison of the repeatability of quantitative data measured in high-performance liquid chromatography with UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A* 873 (2), Seite 163-173.
- [220] Baselt, R. C. und Cravey, R. H. (1995): Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 4. Auflage, Chemical Toxicology Institute, Foster City, USA, ISBN: 0-9626523-1-8.
- [221] Bocchi, C.; Careri, M.; Groppi, F.; Mangia, A.; Manini, P. und Mori, G. (1996): Comparative investigation of UV, electrochemical and particle beam mass spectrometric detection for the high-performance liquid chromatographic determination of benzoic and cinnamic acids and of their corresponding phenolic acids, *Journal of Chromatography A* 753 (2), Seite 157-170.
- [222] Doerffel, K. (1987): Statistik in der analytischen Chemie, 4., durchgesehene Auflage, VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.
- [223] Horwitz, W. (1982): Evaluation of analytical methods for regulation of foods and drugs, *Analytical Chemistry* 54, Seite 67A-76A.
- [224] Herzler, M.; Wittweg, M. und Pragst, F. (2002): Nachweis und quantitative Bestimmung einiger Lösemittel und anderer flüchtiger Substanzen durch HPLC mit Photodiodenarray-Detektor, *Toxichem + Krimtech* 69 (1), Seite 13-23.
- [225] Clarke, E. G. C.; Moffat, A. C.; Jackson, J. V.; Moss, M. S.; Widdop, B. (1986): Clarke's isolation and identification of drugs, 2. Auflage, The Pharmaceutical Press, London, ISBN: 0-85369-166-5.
- [226] Stockhausen, M. (1987): Mathematische Behandlung naturwissenschaftlicher Probleme, 2. überarb. u. erw. Auflage, Steinkopff Verlag, Darmstadt, ISBN: 3-7985-0702-3.

9 ANHANG

9.1 Herleitung der Formel für den Fehler der RRT

Nach dem gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz [226] ergibt sich der absolute Fehler Δy einer Messgröße $y = f(x_1, x_2, x_3)$ zu:

$$\Delta y = \sqrt{\left(\frac{\partial y}{\partial x_1} \Delta x_1\right)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial x_2} \Delta x_2\right)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial x_3} \Delta x_3\right)^2} \quad (54)$$

Mit $y = RRT_{i,s}$, $x_1 = RT_i$, $x_2 = RT_s$ und $x_3 = T_0$ folgt:

$$\Delta RRT_{i,s} = \sqrt{\left(\frac{\partial RRT_{i,s}}{\partial RT_i} \Delta RT_i\right)^2 + \left(\frac{\partial RRT_{i,s}}{\partial RT_s} \Delta RT_s\right)^2 + \left(\frac{\partial RRT_{i,s}}{\partial T_0} \Delta T_0\right)^2} \quad (55)$$

Nach Gl. (2), S. 21, gilt: $RRT_{i,s} = a \times RT_i + b$ mit $a = 1/(RT_s - T_0)$ und $b = -T_0/(RT_s - T_0)$. Es folgt:

$$\frac{\partial RRT_{i,s}}{\partial RT_i} = \frac{1}{RT_s - T_0} \quad (56)$$

Mit $f(T_0) = RT_i - T_0$ ($\rightarrow df/dT_0 = -1$) und $g(T_0) = RT_s - T_0$ ($\rightarrow dg/dT_0 = -1$) gilt: $RRT_{i,s} = f/g$ und demnach die Quotientenregel:

$$\frac{\partial RRT_{i,s}}{\partial T_0} = \frac{(f' \times g - f \times g')}{g^2} = \frac{-(RT_s - T_0) + (RT_i - T_0)}{(RT_s - T_0)^2} = \frac{RT_i - RT_s}{(RT_s - T_0)^2} \quad (57)$$

Mit $\xi = (RT_s - T_0)$ und $RRT_{i,s} = f(\xi) = (RT_i - T_0)/\xi$ kann die Kettenregel angewendet werden:

$$\frac{\partial RRT_{i,s}}{\partial RT_s} = \frac{\partial RRT_{i,s}}{\partial \xi} \frac{\partial \xi}{\partial RT_s} \quad (58)$$

mit

$$\frac{\partial RRT_{i,s}}{\partial \xi} = -\frac{RT_i - T_0}{\xi^2} = -\frac{RT_i - T_0}{(RT_s - T_0)^2} \quad (59)$$

und

$$\frac{\partial \xi}{\partial RT_s} = 1 \quad (60)$$

folgt dann:

$$\frac{\partial RRT_{i,s}}{\partial RT_s} = -\frac{RT_i - T_0}{(RT_s - T_0)^2} \quad (61)$$

Einsetzen der Gl. (56), (57) und (61) in Gl. (55) ergibt dann den Ausdruck für $\Delta RRT_{i,s}$:

$$\Delta RRT_{i,s} = \sqrt{\left(\frac{\Delta RT_i}{RT_s - T_0}\right)^2 + \left(\frac{(RT_i - RT_s) \times \Delta T_0}{(RT_s - T_0)^2}\right)^2 + \left(-\frac{(RT_i - T_0) \times \Delta RT_s}{(RT_s - T_0)^2}\right)^2} \quad (62)$$

Ausklammern von $1/(RT_s - T_0)^2$ ergibt:

$$\Delta RRT_{i,s} = \frac{1}{(RT_s - T_0)^2} \sqrt{[(RT_s - T_0) \times \Delta RT_i]^2 + [(RT_i - RT_s) \times \Delta T_0]^2 + [(RT_i - T_0) \times \Delta RT_s]^2} \quad (63)$$

Setzt man - wie in der vorliegenden Arbeit - einen einheitlichen Variationskoeffizienten für alle Retentionszeiten an, gilt also $VK_{RT}/100 \% = \Delta T_0/T_0 = \Delta RT_i/RT_i = \Delta RT_s/RT_s$, kann man diesen ebenfalls vor die Wurzel ziehen und es folgt die auf S. 72 angegebene Gl. (21).

Aus dieser Formel wurden die Absolutfehler der RRT für alle Substanzen jeweils für den 68,3 % (± 1 s, bezogen auf RT)- und den 95,4 % (± 2 s)- Konfidenzbereich (s. Abschnitt 4.5.3) berechnet. Hierfür wurde der Absolutfehler der jeweiligen RT_i durch Multiplikation mit dem einfachen (68,3 % - Konfidenz) bzw. doppelten (95,4 %) Variationskoeffizienten (El. A: 3,0 %, El. B: 5,0 %, s. Tab. 11, S. 71) ermittelt. Analog wurden für ΔT_0 bzw. ΔRT_s jeweils die einfache bzw. doppelte Standardabweichung aus Tab. 11 verwendet. Software: MS Excel [213].

9.2 Substanzlisten

9.2.1 Substanzen mit ein- oder mehrfachsubstituiertem Phenylchromophor

(aus technischen Gründen wurde hier der englische INN angegeben)

Acetylcodeine	Benzyl alcohol	(4-Chloro-2-methylphen- oxy)acetic acid (MCPA)	3,5-Dichlorophenol
N-Acetyl-L-tyrosine	Benzylamine	Chloroneb	2,4-Dichlorophenoxy- acetic acid (2,4-D)
Ajmaline	Benzyl isovalerate	2-Chlorophenol	Dichlorprop
Alclofenac	Benzylpenicillin	3-Chlorophenol	Dihydrocodeine
4-Allylanisole	1-Benzylpiperazine	4-Chlorophenol	Dihydronorketamine
2-(Allyloxy)-1,3,5- tribromobenzene	Betaxolol	4-Chlorophenoxyacetic acid	3,5-Diiodotyrosine
Alphaprodine	Bethanidine	1-(3-Chlorophenyl)- piperazine (CPP)	Dimetamfetamine
Alprenolol	Bibrocathol	6-Chlorothymol	2,5-Dimethoxy-4-bromo- amphetamine (DOB)
Ambroxol	Bicyclophenamine	Chloroxylenol	2,5-Dimethoxy-4-methyl- amphetamine (DOM)
Ambucetamide	Biperiden	Chlorphenesin	3,4-Dimethoxyphenethyl- amine
4-Aminophenol	N-Bis(desalkyl)verapamil (D 620)	Chlorphentermine	2,5-Dimethoxy-4-(propyl- thio)phenethylamine
Aminorex	Bisoprolol	Ciclonium	4-(Dimethylamino)phenol
Amorolfine	Bornaprine, isomer 1	Cilazapril	2,4-Dimethylphenol (2,4-Xylenol)
Amoxicillin	Bornaprine, isomer 2	Clenbuterol	2,5-Dimethylphenol (2,5-Xylenol)
Amphetamine	Bromhexine	Clobutinol	2,6-Dimethylphenol (2,6-Xylenol)
Ampicillin	Bromobenzene	Clofenciclan	3,4-Dimethylphenol (3,4-Xylenol)
Amygdalin	4-Bromo-2,5-dimethoxy- phenethylamine	Clofexamide	3,5-Dimethylphenol (3,5-Xylenol)
Aniline	6-Bromothymol	Clofibrate	Dioxethedrin
Anisole	Bufexamac	Codeine	Dipipraverine
Arbutin	Bupranolol	m-Cresol	Dopamine
Atenolol	Buprenorphine	o-Cresol	Drofenine
Atropine	Butamirate	p-Cresol	Dropropizine
Atropine methylbromide	Butetamate	Cumene	Embutramide
Atropine-N-octyl	Butylated hydroxytoluene	Cyclandelate	Enalapril
Azidocillin	Butylhydroxyanisole	Cyclodrine	Enalaprilat
Bacampicillin	N-Butylscopolamine	Cyclopentolate	Ephedrine
Baclofen	Camylofin	Debrisoquine	Epimestrol
Bamethan	Cannabidiol	Desacetylmetipranolol	Epinephrine (Adrenaline)
Beclamide	Capsaicin	N-Desalkylverapamil (D 617)	Esmolol
Bencyclane	Carbenicillin	Detajmium	17 α -Estradiol
Benserazide	Carbidopa	Dexfenfluramine	17 β -Estradiol
Bensuldazic acid	Carbophenothion	Dextromethorphan	17 β -Estradiol 3-methyl ether
Benzene	Carvacrol	2,4-Dichlorobenzyl alcohol	17 β -Estradiol 17-propionate
Benzododecinium	Chlorambucil	2,3-Dichlorophenol	
Benzonitrile	Chlorindanol	2,4-Dichlorophenol	
Benzoxonium	Chlormezanone	2,5-Dichlorophenol	
Benzquinamide	Chlorobenzene	3,4-Dichlorophenol	
Benzyl acetate	Chlorocresol		

17β-Estradiol 17-undecylate	Hydromorphone	Methyldopa	Oxeladin
Estriol	11-Hydroxy-Δ ⁹ -tetrahydrocannabinol	3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA)	Oxilofrine
Estrone	Hyoscyamine	3,4-Methylenedioxyethamphetamine (MDE)	Oxitropium
Etafedrine	Ibuprofen	3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)	7-Oxomeptazinol
Ethinylestradiol	Iopanoic acid	N-Methylephedrine	Oxprenolol
Ethoheptazine	Ipratropium	Methylphenidate	Oxybutynin
Ethylamphetamine	Iprobenfos	Methylscopolamine	Oxymetazoline
Ethylbenzene	Isalon ""Diaw""	4-Methylthioamphetamine (4-MTA)	Oxymorphone
α-Ethyl-1,3-benzodioxole-5-ethanamine (BDB)	Isoaminile	Methyl trithion	Oxyphencyclimine
Ethylmorphine	Isopentyl mandelate	Metoprolol	Oxyphenonium
Etilefrine	Isoprenaline	Mexiletine	Oxytocin
Eucatropine	o-Isopropoxyphenol	Midodrine	Penbutolol
Febuprol	Ketamine	Miristalkonium	Pentachlorophenol
Fedrilate	Ketobemidone	6-O-Monoacetyl morphine	Pentazocine
Felbamate	Levallorphan	Morphine	Pentorex
Fencamfamine	Levodopa	Morphine-3-β-D-glucuronide	Pentoxyverine
Fenipentol	Levorphanol	Morphine-6-β-D-glucuronide	6-Pentyl-m-cresol
Fenoprop	Lisinopril	Nadolol	Pethidine
Fenoxazoline	Lofexidine	Nalbuphine	Phenamacide
Fenpentadiol	Mandelic acid	Nalmefene	Phencyclidine
Fenpropidine	MCPA methyl ester	Nalorphine	Phendimetrazine
Fenpropimorph	MCPB	Naloxone	Phenelzine
Fenproporex	Meclofenoxate	Naltrexone	Phenethylamine
4-Fluorophenylalanine	Mecoprop	Nitrobenzene	Pheneticillin
3-Fluorotyrosine	Mecoprop methyl ester	Nonivamide	Phenmetrazine
Fosinopril	Mefenorex	Nonoxynol	Phenol
Galantamine	Mefexamide	Norbuprenorphine	2-Phenoxyethanol
Gemfibrozil	Melphalan	Norcodeine	Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V)
Gepefrine	Mephenesin	Norephedrine (Phenylpropanolamine)	3-Phenoxypropan-1-ol
Glycopyrronium	Mephentermine	Norfeneffrine	3-Phenoxypropane-1,2-diol
Guafecainol	Meptazinol	Norketamine	Phenprobamate
Guaiacol	Mescaline	Normeperidine	Phentermine
Guaifenesin	Mestranol	Normorphine	Phenthoate
Guanoxan	Metamphetamine	Norpseudoephedrine (Cathine)	Phenylacetic acid
Haloprogin	Metanephine	Nortilidine	Phenylacetone
Hetacillin	Metaraminol	Octopamine	Phenylephrine
Hexabromobenzene	Methocarbamol	Orbencarb	1-Phenylethanol
Hexachlorobenzene	Methoxamine	Orciprenaline	2-Phenylethanol
Hexocyclium	4-Methoxyamphetamine	Oxedrine	Phenylethylmalonamide
4-Hexylresorcinol	1-(4-Methoxyphenyl)-piperazine (MeOPP)		Phloroglucinol
Homatropine	4-Methylaminorex		Pholcodine
Hordenine	N-Methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine (MBDB)		Pholedrine
Hydrocodone			Piperonyl butoxide

Pirprofen	Resorcinol	Δ^8 -Tetrahydrocannabinol	Tridihexethyl
Pivampicillin	Roxatidine acetate	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	1-(3-Trifluoromethylphenyl)-piperazine (TFMPP)
Prajmalium	Safrole	Tetramisole	Trihexyphenidyl
Pramocaine	Salbutamol	Tetryzoline	Triperiden, isomer 1
Praziquantel	Salicin	Thiobencarb	Triperiden, isomer 2
Primidone	Salicyl alcohol	Thymopentin	Tropic acid
Procyclidine	Scopolamine	Tilidine	Tulobuterol
Prolintane	Selegiline	Tiludronic acid	Tyramine
Propanidid	Sibutramine	Tirofiban	Valethamate
Propargite	Spirapril	Tolazoline	Venlafaxine
Propicillin	Sultamicillin	Toliprolol	Viloxazine
Propicyclidine	Tebutam	Toluene	m-Xylene
Propofol	Terbutaline	Tramadol	o-Xylene
Prosulfocarb	Tertatolol	Trandolapril	p-Xylene
Pseudoephedrine	Tetrabromo-o-cresol	Tranlycypromine	Xylometazoline
Quinagolide	2,3,4,5-Tetrachlorophenol	2,4,6-Tribromophenol	
Quinestrol	2,3,4,6-Tetrachlorophenol	Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	
Ramipril	2,3,5,6-Tetrachlorophenol		

9.2.2 Substanzen mit einfachsubstituiertem Phenylchromophor

Alphaprodine	Bethanidine	Enalapril	Isalon ""Diwag""
Amphetamine	Bicyclophenamine	Enalaprilat	Isoaminile
Ampicillin	Biperiden	Ephedrine	Isopentyl mandelate
Aniline	Bornaprine, isomer 1	Etafedrine	Lisinopril
Anisole	Bornaprine, isomer 2	Ethoheptazine	Mandelic acid
Atropine	Bromobenzene	Ethylamphetamine	Mefenorex
Atropine methylbromide	Butamirate	Ethylbenzene	Mephentermine
Atropine-N-octyl	Butetamate	Eucatropine	Metamphetamine
Azidocillin	N-Butylscopolamine	Febuprol	4-Methylaminorex
Bacampicillin	Camylofin	Fedrilate	N-Methylephedrine
Beclamide	Carbenicillin	Felbamate	Methylphenidate
Bencyclane	Chlorobenzene	Fencamfamine	Methylscopolamine
Bensuldazic acid	Ciclonium	Fenipentol	Miristalkonium
Benzododecinium	Cilazapril	Fenproporex	Nitrobenzene
Benzonitrile	Cumene	Fosinopril	Norephedrine (Phenylpropanolamine)
Benzoxonium	Cyclandelate	Glycopyrronium	Norpseudoephedrine (Cathine)
Benzyl acetate	Cyclodrine	Hetacillin	Nortilidine
Benzyl alcohol	Cyclopentolate	Hexocyclium	Oxeladin
Benzylamine	Dimetamfetamine	Homatropine	Oxitropium
Benzyl isovalerate	Dipiproverine	Hyoscyamine	Oxybutynin
Benzylpenicillin	Drofenine	Ipratropium	
1-Benzylpiperazine	Dropropizine	Iprobenfos	Oxyphencyclimine

Oxyphenonium	Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V)	Procyclidine	Tilidine
Pentorex	3-Phenoxypropan-1-ol	Prolintane	Tolazoline
Pentoxyverine	3-Phenoxypropane-1,2-diol	Propicillin	Toluene
Pethidine	Phenprobamate	Propicyclidine	Trandolapril
Phenamacide	Phentermine	Prosulfocarb	Tranylecypromine
Phencyclidine	Phenthoate	Pseudoephedrine	Tridihexethyl
Phendimetrazine	Phenylacetic acid	Ramipril	Trihexyphenidyl
Phenelzine	Phenylacetone	Scopolamine	Triperiden, isomer 1
Phenethylamine	1-Phenylethanol	Selegiline	Triperiden, isomer 2
Pheneticillin	2-Phenylethanol	Spirapril	Tropic acid
Phenmetrazine	Phenylethylmalonamide	Sultamicillin	Valethamate
Phenol	Pivampicillin	Tebutam	
2-Phenoxyethanol	Primidone	Tetramisole	

9.3 Tabellierte Ergebnisse der Diskriminanzanalyse

9.3.1 Hauptgruppen

Tab. 52: Diskriminanzkoeffizienten (nicht standardisiert) und Werte bei den Gruppenzentroiden der Hauptgruppen.

	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉
Koeffizient bei 200 nm	15,281	-24,990	45,803	-19,988	3,784	38,567	-7,275	29,672	20,513
Koeffizient bei 202 nm	-12,893	47,273	-88,262	42,265	31,987	-91,479	31,396	-91,267	-84,585
Koeffizient bei 204 nm	1,225	-13,927	64,817	-42,897	-56,801	63,155	-30,222	76,203	89,747
Koeffizient bei 210 nm	23,482	-35,591	-20,071	77,980	96,424	-36,098	23,539	-44,105	-81,801
Koeffizient bei 212 nm	-29,045	24,104	-19,174	-58,973	-81,841	13,826	-11,385	22,716	85,414
Koeffizient bei 214 nm	5,546	38,743	39,093	-44,732	-28,649	11,882	-22,792	41,342	-9,401
Koeffizient bei 216 nm	14,233	-27,669	-8,232	34,909	44,458	6,599	22,406	-50,574	-38,524
Koeffizient bei 218 nm	-0,401	-20,025	-0,438	39,413	38,914	-4,595	-1,917	18,335	7,717
Koeffizient bei 220 nm	-12,199	21,565	-18,173	-37,383	-64,614	-18,095	0,809	-18,608	15,617
Koeffizient bei 226 nm	14,371	2,802	17,079	23,066	79,920	40,940	-26,442	51,131	-31,997
Koeffizient bei 228 nm	-5,378	-1,697	-11,445	-20,481	-57,739	-25,514	26,086	-36,665	31,976
Koeffizient bei 242 nm	-9,290	22,825	17,644	31,489	-0,046	4,860	-12,094	-10,940	-25,144
Koeffizient bei 246 nm	-13,944	-54,925	-10,822	-61,654	16,057	-23,239	14,510	19,184	32,946
Koeffizient bei 252 nm	31,057	75,937	-10,057	77,955	-28,190	39,801	12,788	-28,500	-26,241
Koeffizient bei 254 nm	-19,356	-41,928	12,777	-44,882	18,218	-23,486	-17,996	20,965	12,695
Koeffizient bei 274 nm	-0,820	2,137	6,755	1,113	-0,676	-8,869	-1,085	-3,043	-2,007
Koeffizient bei 282 nm	-1,060	-8,741	-31,364	-19,999	19,732	24,115	-26,487	-2,673	10,187
Koeffizient bei 292 nm	1,182	47,735	93,142	74,370	-85,189	-90,948	87,387	-3,474	17,462
Koeffizient bei 298 nm	-38,489	-68,193	-103,087	-115,449	143,482	126,517	-76,366	44,336	-84,324
Koeffizient bei 304 nm	128,515	36,839	20,666	62,879	-124,863	-109,235	0,074	16,885	90,652
Koeffizient bei 310 nm	-124,995	-20,812	37,982	10,227	45,792	66,370	10,863	-73,446	-51,017
Koeffizient bei 326 nm	88,571	50,170	-106,766	-69,108	47,984	-27,269	48,814	73,374	47,211
Koeffizient bei 336 nm	-101,848	-145,727	204,745	76,808	-126,017	3,907	-143,614	-93,777	-44,297
Koeffizient bei 340 nm	60,689	148,345	-84,470	12,009	63,974	24,588	115,637	21,868	23,154
Koeffizient bei 366 nm	-104,116	-145,743	-82,366	-83,047	15,593	-22,961	52,422	118,127	-11,402
Koeffizient bei 380 nm	214,740	187,770	10,876	140,025	-54,405	137,841	-15,868	-145,882	4,345
Konstante	-4,995	-6,006	-7,700	2,862	-7,107	2,205	-1,645	1,301	0,394
Funktionswert Zentroid Gruppe 1	2,715	2,283	0,158	-1,211	0,371	-1,482	0,000	0,930	-0,477
Funktionswert Zentroid Gruppe 2	1,998	5,072	0,445	-1,214	1,515	0,680	1,314	-0,478	0,453
Funktionswert Zentroid Gruppe 3	-0,035	5,237	3,306	2,174	-1,191	0,563	-0,484	-0,045	-0,133
Funktionswert Zentroid Gruppe 4	2,614	0,487	-2,568	0,370	-2,400	-2,899	0,149	-0,770	0,784
Funktionswert Zentroid Gruppe 5	4,199	-2,739	1,098	-2,078	-1,711	1,473	-0,300	0,536	0,600
Funktionswert Zentroid Gruppe 6	4,394	-1,799	-0,184	-2,032	-1,182	0,546	-0,006	-1,340	-1,338
Funktionswert Zentroid Gruppe 7	5,541	-3,607	0,373	1,284	0,986	-0,063	0,043	-0,029	0,029
Funktionswert Zentroid Gruppe 8	-11,918	-2,262	-0,871	0,724	-0,776	0,300	0,999	0,298	-0,199
Funktionswert Zentroid Gruppe 9	-9,967	-0,466	0,691	-0,964	1,253	-0,347	-1,119	-0,358	0,221
Funktionswert Zentroid Gruppe 10	2,459	3,891	-8,495	0,933	0,261	1,637	-0,870	0,232	-0,080

9.3.2 Trizyklische Verbindungen

Tab. 53: Aufspaltung der Hauptgruppe 1 in weitere Untergruppen.

Gruppe	Struktur	Anzahl	Gruppe	Struktur	Anzahl
1.1.1		3	1.2.6		2
1.1.2		2	1.2.7		3
1.1.3		2	1.2.8		2
1.1.4		2	1.2.9		1
1.1.5		1	1.3.1		4
1.1.6		1	1.3.2		4
1.1.7		1	1.3.3		3
1.2.1		3	1.4.1		2
1.2.2		6	1.4.2		2
1.2.3		2	1.4.3		3
1.2.4		2	1.5.1		3
1.2.5		2	1.5.2		2

Tab. 54: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 1.1 bis 1.5.

	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄		Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
Koeffizient bei 204 nm	-15,798	-0,243	26,904	-12,335	Koeffizient bei 360 nm	-578,705	-113,299	54,498	-191,075
Koeffizient bei 206 nm	6,653	4,168	-24,474	17,690	Konstante	1,625	-5,145	-7,002	-6,904
Koeffizient bei 218 nm	-2,866	4,353	8,372	4,250					
Koeffizient bei 228 nm	4,891	-6,794	-4,962	-2,098					
Koeffizient bei 256 nm	42,719	-5,500	16,193	31,067	Funktionswert Zentroid Gruppe 1.1	-4,081	-0,431	-0,558	1,097
Koeffizient bei 260 nm	-37,900	16,050	-21,419	-28,661	Funktionswert Zentroid Gruppe 1.2	-0,132	0,049	1,225	-0,156
Koeffizient bei 274 nm	20,783	-13,104	23,889	1,376	Funktionswert Zentroid Gruppe 1.3	2,550	2,341	-0,909	-0,150
Koeffizient bei 288 nm	4,626	15,103	-15,645	-1,659	Funktionswert Zentroid Gruppe 1.4	8,384	-2,212	-0,724	0,022
Koeffizient bei 348 nm	232,225	22,413	7,264	32,494	Funktionswert Zentroid Gruppe 1.5	-6,944	-1,244	-1,279	-1,617

9.3.3 Benzodiazepine

Tab. 55: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 2.1 bis 2.4.

	Y ₁	Y ₂	Y ₃		Y ₁	Y ₂	Y ₃
Koeffizient bei 218 nm	1,548	-12,443	2,169	Konstante	-4,089	7,299	3,289
Koeffizient bei 242 nm	11,778	1,606	-8,765				
Koeffizient bei 322 nm	-104,201	-492,200	-171,288				
Koeffizient bei 326 nm	178,708	843,606	278,812	Funktionswert Zentroid Gruppe 2.1	1,912	-3,730	1,610
Koeffizient bei 342 nm	-276,080	-1135,419	-231,735	Funktionswert Zentroid Gruppe 2.2	2,136	-1,414	-3,770
Koeffizient bei 352 nm	-85,845	1303,739	52,697	Funktionswert Zentroid Gruppe 2.3	-15,222	0,724	0,118
Koeffizient bei 360 nm	196,539	-534,192	50,710	Funktionswert Zentroid Gruppe 2.4	4,027	2,340	0,526

9.3.4 Phenothiazine

Tab. 56: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 3.1 bis 3.3.

	Y ₁	Y ₂		Y ₁	Y ₂
Koeffizient bei 200 nm	-19,149	27,414	Koeffizient bei 334 nm	-1556,408	633,545
Koeffizient bei 206 nm	58,691	-83,219	Koeffizient bei 336 nm	1048,714	-481,722
Koeffizient bei 214 nm	20,685	102,344	Koeffizient bei 360 nm	-135,916	-191,733
Koeffizient bei 220 nm	-88,698	-31,386	Koeffizient bei 380 nm	260,738	479,870
Koeffizient bei 224 nm	50,629	-7,273	Konstante	-22,382	-1,536
Koeffizient bei 262 nm	17,260	38,887			
Koeffizient bei 268 nm	-2,705	-59,776			
Koeffizient bei 270 nm	18,391	55,395	Funktionswert Zentroid Gruppe 3.1	16,435	-13,579
Koeffizient bei 280 nm	-30,926	-18,658	Funktionswert Zentroid Gruppe 3.2	9,541	5,739
Koeffizient bei 322 nm	375,645	-292,086	Funktionswert Zentroid Gruppe 3.3	-50,829	-1,895

Tab. 57: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 3.1.1 und 3.1.2.

	Y_1		Y_1
Koeffizient bei 248 nm	107,040	Konstante	-153,757
Koeffizient bei 260 nm	165,973		
Koeffizient bei 330 nm	-10291,127	Funktionswert Zentroid Gruppe 3.1.1	-14,158
Koeffizient bei 332 nm	11250,200	Funktionswert Zentroid Gruppe 3.1.2	11,798

Tab. 58: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 3.2.1 bis 3.2.3.

	Y_1	Y_2		Y_1	Y_2
Koeffizient bei 212 nm	8,921	25,449	Konstante	-22,682	-21,263
Koeffizient bei 224 nm	-42,539	-22,916			
Koeffizient bei 240 nm	39,307	5,892	Funktionswert Zentroid Gruppe 3.2.1	21,671	-5,846
Koeffizient bei 268 nm	19,455	30,818	Funktionswert Zentroid Gruppe 3.2.2	-6,628	-4,910
Koeffizient bei 286 nm	15,060	-25,550	Funktionswert Zentroid Gruppe 3.2.3	0,555	8,375

9.3.5 Opiate

Tab. 59: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 4.1 bis 4.6.

	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅		Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	
Koeffizient 200 nm	21,430	-74,648	39,748	-33,638	-27,082	Zentroid Gr. 4.1 Zentroid Gr. 4.2 Zentroid Gr. 4.3 Zentroid Gr. 4.4 Zentroid Gr. 4.5 Zentroid Gr. 4.6	Konstante	-108,410	-53,634	-41,530	-4,660	-1,121
Koeffizient 203 nm	-260,896	323,904	-2,326	100,709	61,069							
Koeffizient 206 nm	430,951	-279,039	28,916	-96,457	-54,798		Zentroid Gr. 4.1	-0,325	-22,359	2,400	-0,932	0,678
Koeffizient 211 nm	-275,645	163,095	-28,070	163,422	79,455		Zentroid Gr. 4.2	25,725	-3,874	-18,777	-3,051	-1,260
Koeffizient 213 nm	262,367	-17,365	-0,008	-109,046	-50,869		Zentroid Gr. 4.3	25,414	9,572	2,291	-1,270	0,341
Koeffizient 234 nm	-163,932	-406,023	-88,752	-175,332	-6,520		Zentroid Gr. 4.4	-130,278	6,548	-1,449	-0,185	0,118
Koeffizient 242 nm	-178,985	697,689	704,714	15,867	-545,107		Zentroid Gr. 4.5	5,067	-3,159	6,380	2,704	-2,437
Koeffizient 244 nm	146,621	-500,201	-577,138	67,785	559,869		Zentroid Gr. 4.6	23,130	2,043	-7,218	8,585	1,168

9.3.6 Diphenylmethanderivate

Tab. 60: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 5.1 bis 5.3.

	Y ₁	Y ₂		Y ₁	Y ₂
Koeffizient bei 212 nm	35,840	85,128	Koeffizient bei 264 nm	2786,970	2861,194
Koeffizient bei 219 nm	3,202	-59,582	Koeffizient bei 302 nm	-3338,502	-1431,323
Koeffizient bei 240 nm	417,733	171,051	Koeffizient bei 304 nm	3058,469	979,788
Koeffizient bei 252 nm	-2068,851	-1081,539	Konstante	-15,813	-33,620
Koeffizient bei 255 nm	-5443,932	-2878,783			
Koeffizient bei 258 nm	2475,408	-931,421	Funktionswert Zentroid Gruppe 5.1	6,167	3,359
Koeffizient bei 259 nm	1586,584	6037,109	Funktionswert Zentroid Gruppe 5.2	1,556	-3,726
Koeffizient bei 263 nm	104,540	-3697,248	Funktionswert Zentroid Gruppe 5.3	-80,307	1,987

9.3.7 Barbiturate

Tab. 61: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 6.1 bis 6.5.

	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄		Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
Koeffizient bei 201 nm	153,973	159,102	128,429	207,779	Funktionswert Zentroid Gruppe 6.1	1,955	-4,069	-0,224	-0,239
Koeffizient bei 209 nm	-144,061	-253,442	-299,236	-388,449	Funktionswert Zentroid Gruppe 6.2	0,450	-8,423	1,454	0,356
Koeffizient bei 210 nm	129,145	192,482	304,164	364,707	Funktionswert Zentroid Gruppe 6.3	9,661	18,354	1,039	0,001
Koeffizient bei 227 nm	27,277	52,243	15,054	-8,564	Funktionswert Zentroid Gruppe 6.4	3,406	3,044	-2,947	0,366
Koeffizient bei 300 nm	-7412,969	79,124	-75,974	-213,781	Funktionswert Zentroid Gruppe 6.5	-74,575	8,394	0,108	-0,014
Konstante	-129,358	-114,345	-119,895	-170,652					

9.3.8 "Toluolderivate"

Tab. 62: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 7.1 und 7.2.

	Y ₁		Y ₁
Koeffizient bei 210 nm	30,098	Koeffizient bei 276 nm	-479,380
Koeffizient bei 214 nm	-85,056	Konstante	-0,837
Koeffizient bei 217 nm	46,271		
Koeffizient bei 225 nm	39,7490		
Koeffizient bei 234 nm	-83,179	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.1	-3,385
Koeffizient bei 247 nm	332,314	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.2	4,161

Tab. 63: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 7.1.1 bis 7.1.3.

	Y ₁	Y ₂		Y ₁	Y ₂
Koeffizient bei 203 nm	-36,240	-38,733	Koeffizient bei 266 nm	-130,855	-166,774
Koeffizient bei 211 nm	66,815	34,786	Koeffizient bei 272 nm	-1700,203	-981,135
Koeffizient bei 214 nm	-44,744	-56,495	Koeffizient bei 273 nm	980,409	880,871
Koeffizient bei 220 nm	2,160	182,571	Konstante	-6,596	24,863
Koeffizient bei 221 nm	39,020	-192,687			
Koeffizient bei 228 nm	-107,386	292,021	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.1.1	1,646	-1,735
Koeffizient bei 238 nm	-170,653	-888,093	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.1.2	2,475	4,176
Koeffizient bei 250 nm	964,013	946,403	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.1.3	-10,434	0,445

Tab. 64: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 7.2.1 und 7.2.2.

	Y ₁		Y ₁
Koeffizient bei 201 nm	-325,428	Konstante	200,157
Koeffizient bei 205 nm	115,872		
Koeffizient bei 226 nm	20,999		
Koeffizient bei 258 nm	299,291	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.2.1	-8,572
Koeffizient bei 276 nm	-678,293	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.2.2	1,978

Tab. 65: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 7.2.2.1 bis 7.2.2.4.

	Y ₁	Y ₂	Y ₃		Y ₁	Y ₂	Y ₃
Koeffizient bei 209 nm	-243,132	-3,294	-103,128	Koeffizient bei 274 nm	1482,592	524,351	-2468,821
Koeffizient bei 211 nm	818,502	381,748	96,331	Koeffizient bei 275 nm	-2447,089	-935,506	1417,017
Koeffizient bei 212 nm	-579,336	-351,850	25,695	Konstante	-43,661	-63,509	-15,810
Koeffizient bei 226 nm	265,095	247,928	42,099				
Koeffizient bei 233 nm	-762,158	-825,481	217,263				
Koeffizient bei 236 nm	861,282	810,114	-463,022	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.2.2.1	-5,082	0,929	-1,245
Koeffizient bei 249 nm	-515,278	-515,058	1612,736	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.2.2.2	9,482	-2,830	-1,775
Koeffizient bei 255 nm	109,847	-794,279	-911,248	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.2.2.3	-2,179	-2,225	2,567
Koeffizient bei 259 nm	587,385	1550,001	168,192	Funktionswert Zentroid Gruppe 7.2.2.4	8,361	5,253	1,584

9.3.9 Steroide vom "Cyclohexadienontyp"

Tab. 66: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 9.1 bis 9.4.

	Y ₁	Y ₂	Y ₃		Y ₁	Y ₂	Y ₃
Koeffizient bei 221 nm	10,955	-10,174	10,527	Funktionswert Zentroid Gruppe 9.1	3,113	4,031	-0,487
Koeffizient bei 256 nm	-101,944	-119,942	160,166	Funktionswert Zentroid Gruppe 9.2	3,729	-3,411	0,503
Koeffizient bei 263 nm	9,311	511,516	-511,865	Funktionswert Zentroid Gruppe 9.3	-9,835	4,250	1,197
Koeffizient bei 267 nm	163,256	-440,492	480,354	Funktionswert Zentroid Gruppe 9.4	-7,970	-4,304	-1,023
Koeffizient bei 279 nm	-81,103	91,983	-182,994				
Konstante	4,311	-4,554	-26,552				

9.3.10 Herzglykoside

Tab. 67: Nicht-standardisierte Diskriminanzkoeffizienten und Funktionswerte der Gruppenzentroide bei der SDA zwischen den Gruppen 10.1 und 10.2.

	Y ₁		Y ₁
Koeffizient bei 219 nm	517,520	Funktionswert Zentroid Gruppe 10.1	1,301
Konstante	-515,879	Funktionswert Zentroid Gruppe 10.2	-8,674

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geboren am 23.12.1966 in Münster/Westfalen, verheiratet, zwei Kinder (geb. 1998 und 2001).

Schule

- 1973 - 1977 Wartburg-Grundschule, Münster/Westfalen.
1977 - 1986 Schiller-Gymnasium, Münster/Westfalen, Abschluss: Abitur.
09/83 - 12/83 Newpark Comprehensive School, Dublin, Republik Irland.

Universität

- 1987 Ein Semester Studium der Anglistik, Philosophie und Neuen Geschichte an der Westfälischen Wilhelms-Universität (WWU), Münster/Westfalen.
1987/88 Ein Semester Studium der Chemie an der WWU Münster.
1988 - 1996 Studium der Chemie an der TU Berlin. Vertiefungsfach: Physikalische Chemie, Wahlpflichtfach: Analytische Chemie, Abschluss: Diplom-Chemiker.
12/95 - 08/96 Diplomarbeit mit dem Thema: "Untersuchungen zum Abbau des Farbstoffes 'C.I. Reactive Black 5'. Trennung und Identifizierung der Metabolite" am Institut für Synthetische und Analytische Chemie der Technischen Universität Berlin, durchgeführt am Institut für Technischen Umweltschutz und am Institut für Umweltverfahrenstechnik der TU Berlin.
seit 1997 Promotion. Thema: "Über die Aussagesicherheit bei der Substanzidentifizierung mittels HPLC-DAD in der Systematischen Toxikologischen Analyse unter Verwendung einer selbsterstellten UV-Spektrenbibliothek mit 2.682 Einträgen". Institut für Rechtsmedizin der HU Berlin, Abteilung Toxikologische Chemie.
10/98 - 04/02 Postgradualstudium Toxikologie und Umweltschutz an der Universität Leipzig. Abschluss: Fachchemiker für Toxikologie.

Arbeit

- 02/97-09/02 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Rechtsmedizin der HU Berlin, Abteilung Toxikologische Chemie (Prof. Pragst). Aufgabengebiete: Analytische Untersuchungen von Humanproben auf toxische Substanzen im Rahmen der Erstellung forensisch-toxikologischer Gutachten und der klinischen Diagnose akuter Vergiftungen. Messung, Erstellung und Publikation einer UV-Spektrenbibliothek mit knapp 2.700 Einträgen.
seit 10/02 Wissenschaftlicher Angestellter im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin, Fachgebiet 703: Gesundheitliche Bewertung von Wirk- und Beistoffen in Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmitteln.

Berlin, den 31. Oktober 2002

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und unter ausschließlicher Benutzung der angegebenen Mittel und Methoden angefertigt habe.

Berlin, den 31. Oktober 2002